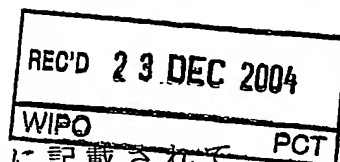


日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

29.10.2004



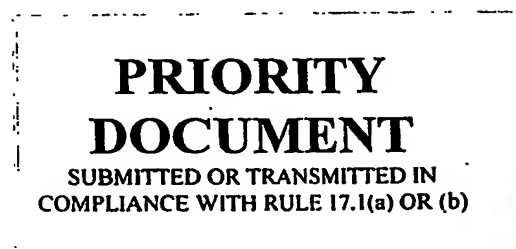
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 8月 5日
Date of Application:

出願番号 特願2004-229871
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2004-229871]

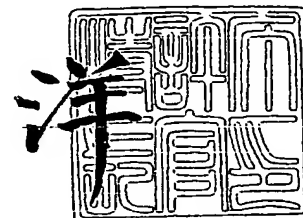
出願人 財団法人先端医療振興財団
Applicant(s): 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所



2004年12月13日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 AB04039
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県木更津市かずさ鎌足二丁目6番地7 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所内
 【氏名】 古閑 比佐志
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県木更津市かずさ鎌足二丁目6番地7 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所内
 【氏名】 小原 収
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22 理化学研究所横浜研究所内
 【氏名】 古閑 明彦
【発明者】
 【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区港島南町二丁目2番地 財団法人先端医療振興財団内
 【氏名】 岡田 光浩
【発明者】
 【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区港島南町二丁目2番地 財団法人先端医療振興財団内
 【氏名】 植村 明嘉
【発明者】
 【住所又は居所】 北海道札幌市豊平区美園9条2-3-10
 【氏名】 荒川 宏樹
【発明者】
 【住所又は居所】 北海道札幌市中央区南19条西9-1-37
 【氏名】 多田 光宏
【特許出願人】
 【持分】 4/8
 【識別番号】 300061835
 【氏名又は名称】 財団法人先端医療振興財団
【特許出願人】
 【持分】 3/8
 【識別番号】 596175810
 【氏名又は名称】 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所
【特許出願人】
 【持分】 1/8
 【識別番号】 503360115
 【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代理人】
 【識別番号】 100100181
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 阿部 正博
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2003-371040
 【出願日】 平成15年10月30日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 053419

【納付金額】 16,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0319213

【包括委任状番号】 9904161

【包括委任状番号】 0316565

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

以下の (a) 又は (b) のポリペプチドをコードする塩基配列から成る DNA: (a) 配列番号: 1 又は配列番号: 15 で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列の一部又は全部から成るポリペプチド; 又は (b) 配列番号: 1 又は配列番号: 15 で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列から成り、(a) のポリペプチドと実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチド。

【請求項 2】

以下の (a)、(b) 又は (c) の DNA: (a) 配列番号: 2 又は配列番号: 16 で示される塩基配列において、配列番号: 1 又は配列番号: 15 で示されるアミノ酸配列の一部又は全部をコードする DNA; (b) (a) の DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA; 又は (c) (a) の DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、(a) の DNA がコードするポリペプチドと実質的に同質の生物学的活性を有する蛋白質をコードする DNA。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載の DNA を含む齧歯類由来遺伝子。

【請求項 4】

齧歯類がマウスである請求項 3 記載の遺伝子。

【請求項 5】

以下の (a) 又は (b) のポリペプチド: (a) 配列番号: 1 又は配列番号: 15 で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列の一部または全部から成るポリペプチド; 又は (b) 配列番号: 1 又は配列番号: 15 で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列の一部または全部から成り、(a) のポリペプチドと実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチド。

【請求項 6】

請求項 1 若しくは 2 記載の DNA、又は請求項 3 若しくは 4 記載の遺伝子を導入した宿主細胞で作製される組換え蛋白質である、請求項 5 記載のポリペプチド。

【請求項 7】

請求項 1 若しくは 2 記載の DNA、又は請求項 3 若しくは 4 記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項 8】

請求項 7 記載の組換えベクターを導入した組換え動物細胞。

【請求項 9】

請求項 7 記載の組換えベクターを導入した組換え動物。

【請求項 10】

請求項 5 又は 6 記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 11】

請求項 1 若しくは 2 記載の DNA、又は請求項 3 若しくは 4 記載の遺伝子を用いた、血管増殖分化制御因子又は血管増殖分化を制御する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 12】

請求項 11 記載のスクリーニング方法に使用する、遺伝子発現測定キット。

【請求項 13】

請求項 5 又は 6 記載のポリペプチドを用いた、生体内血管増殖分化制御因子又は血管増殖分化を制御する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 14】

請求項 13 記載のスクリーニング方法に使用する、ポリペプチド結合物質測定キット。

【請求項 15】

請求項 8 又は 9 記載の組換え動物又は組換え動物細胞を用いた、生体内血管増殖分化制御

因子又は血管増殖分化を制御する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 記載のスクリーニング方法に使用する、該分化制御因子、化合物の血管増殖分化制御活性測定キット。

【請求項 1 7】

請求項 1 0 記載の抗体を用いた、血管増殖分化制御因子又は血管増殖分化を制御する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 記載のスクリーニング方法に使用する、抗体力価測定キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】新規PlexinポリペプチドとそれをコードするDNA、及びその用途

【技術分野】

【0001】

本発明は、Plexin様配列を有し、個体発生時の血管形成時期の初期から血管形成時期全般を通して血管特異的に発現し、成長後の成体では胃・重層扁平上皮に於いて強い発現、子宮に於いてやや強い発現が、また、脳をはじめとした各種臓器に於いて発現が認められる新規DNA及び該DNAを含む遺伝子、該DNAにコードされる新規ポリペプチド及び該ポリペプチドを含む組換え蛋白質、新規ポリペプチドに対する抗体、並びに、血管細胞増殖分化制御、癌増殖を支持する血管増殖阻害に関わる制御する生体内血管増殖分化制御因子、化合物のスクリーニング方法、及び該分化制御因子、化合物の血管増殖分化制御活性測定キットに関する。

【背景技術】

【0002】

近年のヒトゲノムプロジェクト及びヒトcDNAプロジェクトの成功により、多くのヒト疾患関連遺伝子が同定あるいは推定されるにいたった。しかしながらその一方で倫理上の問題からヒト遺伝子を用いた研究には制約があり、新たな研究の方向性が模索されている。このような観点からモデル生物における相同遺伝子を同定することは、研究を進展させる意味できわめて重要なステップと考えられる。特に齧歯類、とりわけマウスは最も研究が進んでいるモデル生物で、ゲノム情報や変異種の情報も比較的多く蓄積されているが、蓄積されたゲノム情報はまだ十分なものではない。一方、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究がなされ、得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録、公開がなされた。しかし、多くのESTは100塩基長から500塩基長といった短い塩基配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

【0003】

各種臓器においては、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。また、各種臓器における機能の調節には、機能を受け持つ特異的な細胞の増殖やガイダンス、あるいは細胞の活性化が関係している。従って、個体発生時の血管形成時期の初期から血管形成時期全般を通して血管特異的に発現する等、各種臓器に於いて発現が認められる新規な遺伝子を取得して、その遺伝子にコードされる血管形成あるいは各種臓器で複雑な機能を調節する蛋白質を得ることは、医薬品開発に有用である。また、得られた蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現している該蛋白質の遺伝子の機能をホモロジー検索から推定し、その情報を基にして該蛋白質を適当な発現系で発現させて組換え蛋白質を得、更にして該蛋白質に特異的に結合する抗体を得ることが必要であった。また、マウスES細胞を用いた血管形成をモデル化した実験系に於いて、血管形成に関わる遺伝子を網羅的に取得する試みがなされ、基礎的な知見の蓄積が進んでいる（文献14）。しかし、血管形成に関わる4,000塩基長以上の齧歯類、とりわけマウス由来の長大な遺伝子について報告はない。

【0004】

長鎖ヒトcDNAプロジェクトにて、ヒト脳由来のヒトKIAA0620遺伝子(Ishikawa, K., Nagase, T.,; Suyama, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N. and Ohara, O., DNA Res., 1998, 5:169-176, Prediction of the coding sequences of unidentified human genes X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro.; GenBank Accession No. AB014520, 6,754 bp, 1,746aa, Homosapiens, cDNA, KIAA0620, Ohara O. et al.) が報告され、マウス発生過程において血管内皮細胞あるいは中枢神経系(CNS)でヒトKIAA0620関連遺伝子のmRNAが発現していること等が報告(van der Zwaag, B. et al., Dev. Dyn., 2002, 225:336-343)されているが、その機能については不明であった。

【0005】

ヒトKIAA0620遺伝子は染色体3q21.3に存在し、更に、ヒトKIAA0620遺伝子のSNPsも複数箇所報告されている(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&cmd=Display&dopt=nucleotide_snp&from_uid=3327053)。ヒト疾患の大部分が単なる遺伝子の欠失によって引き起こされるのではなく、アミノ酸置換によって蛋白質の機能や活性が一部分だけ変化することにより引き起こされることを鑑みると、ヒトKIAA0620遺伝子は傷治癒、骨折治癒、血管閉塞と側副血行路形成、子宮粘膜での周期的血管網形成(一過性、黄体形成時)等、また、血管新生過程が関与しそれが望ましくない癌増殖、慢性関節リュウマチ、糖尿病性網膜症、子宮内膜症、肥満、また、血管新生過程が望ましい心臓発作、神経変性疾患、足の血行障害、閉塞性動脈硬化症、尋常性乾癬といった各種疾患に関与している可能性が考えられる。ヒトKIAA0620遺伝子を用いた、マウス発生過程での血管内皮細胞あるいは中枢神経系(CNS)でヒトKIAA0620関連遺伝子のmRNAが発現していることが報告されたが、ヒトKIAA0620遺伝子とその関係をより詳細に研究するためには、ヒトではなく実験動物を用いた研究が必須である。しかし、ヒト病態の解明に重要なモデル動物である齧歯類、とりわけマウスに於けるヒトKIAA0620遺伝子に対応する遺伝子は未取得であり、該遺伝子を用いた研究を実施することが出来なかった。

【0006】

【非特許文献1】1. 渋谷正史, 1999, 実験医学, 17:712-715, 血管新生研究の現状と分子調節機構

【非特許文献2】2. 平島正則, 西川伸一, 1999, 実験医学, 17:716-720, 血管内皮細胞の発生学

【非特許文献3】3. 山下潤, 2001, 実験医学, 19:830-835, ES細胞からの血管形成

【非特許文献4】4. 高倉伸幸, 2001, 実験医学, 19:836-840, 血管細胞と血管新生

【非特許文献5】5. 宿南知佐, 柴田洋之, 開祐司, 2001, 実験医学, 19:841-846, 軟骨・骨形成と血管侵入

【非特許文献6】6. 松浦成昭, 岡崎能久, 谷直之, 江口英利, 1999, 実験医学, 17:741-752, 腫瘍の産生する血管新生阻害因子

【非特許文献7】7. ジェイン, R.K.; カルメリ, P.F., 2002, 日経サイエンス, 3月号, 22-29, 医療を変える血管新生の科学

【非特許文献8】8. vander Zwaag, B. et al., Dev. Dyn., 2002, 225:336-343, PLEXIN-D1, a novel plexin family member, is expressed in vascular endothelium and central nervous system during mouse embryogenesis.

【非特許文献9】9. Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodman CS, Poo M, Tessier-Lavigne M, Comoglio PM., 2001, Cell, 99:71-80, Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates.

【非特許文献10】10. Manahan, D., 1997, Science, 277:48-50, Signaling vascular morphogenesis and maintenance.

【非特許文献11】11. Barinaga, M., 1997, Science, 275:482-484, Designing therapies that target tumor blood vessels.

【非特許文献12】12. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schattteman G, Isner JM. Asahara, T. et al., 1997, Science, 275:964-967, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.

【非特許文献13】13. Risau, W., 1997, Nature, 386:671-674, Mechanisms of angiogenesis.

【非特許文献14】14. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S. Flkl-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors.

【非特許文献15】15. Ishikawa K, Nagase T, Suyama M, Miyajima N, Tanaka A,

Kotani H, Nomura N, Ohara O., 1998, DNA Res., 5:169-76, Prediction of the coding sequences of unidentified human genes X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro.

【非特許文献16】16. Tamagnone L.; Comoglio PM., 2000, Trends in Cell Biology, 10:377-383, Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond

【非特許文献17】17. Shimizu M, Murakami Y, Suto F, Fujisawa H, 2000, J. Cell Biol., 148:1283-1293, Determination of cell adhesion sites of neuropilin-1.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従来、ヒト長鎖 cDNA プロジェクトでヒト KIAA0620 遺伝子が取得されていたが、遺伝子情報が完全でなく、その機能に関する情報も不完全であった。すなわち、ヒト KIAA0620 遺伝子をプローブとしてマウス発生過程でのヒト KIAA0620 関連遺伝子発現の検出実験において、血管内皮細胞あるいは中枢神経系(CNS)においてヒト KIAA0620 遺伝子と反応する mRNA が発現していることが報告された。しかし、ヒト KIAA0620 遺伝子あるいはそれと関連する遺伝子の機能についてより詳細に研究するためには、ヒトではなく実験動物を用いた研究が必須であり、ヒト病態の解明に重要なモデル動物である齧歯類に属するラット、マウスあるいはハムスター等、とりわけマウスに於けるヒト KIAA0620 遺伝子に対応する遺伝子とその取得が困難であったため未取得のまま放置され、該遺伝子を用いた研究を実施することが出来なかった。

【0008】

従って、ヒト KIAA0620 遺伝子に関連する齧歯類に由来するラット、マウスあるいはハムスター等、とりわけマウス由来新規遺伝子を取得し、本発明の新規遺伝子がコードする蛋白質の機能に関する情報を得ることは、本発明のポリペプチドの特異的結合蛋白質や、アゴニスト、アンタゴニストを検索する際の非常に重要な手段となる。上記のポリペプチドに対する特異的結合蛋白質が見出されなくても、本発明のポリペプチドの不活化実験（例えば該遺伝子を過剰発現あるいはノックアウトした組換え動物細胞や組換え動物の作製）からそのポリペプチドの生理作用を解析することにより、本発明のポリペプチドに対するアゴニストまたはアンタゴニストを作製することが可能であり、本発明のポリペプチドに対する特異的結合蛋白質、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、各種臓器に関わる疾患の患者の機能不全に関連する疾患の予防あるいは治療薬や診断薬として活用することが可能となる。

【0009】

生体での本発明のポリペプチドの機能の低下または昂進が、各種臓器に関わる疾患の原因となっている場合が考えられる場合がある。この場合には、そのポリペプチド該蛋白質に対するリガンドやリガンド阻害因子、あるいはアンタゴニストやアゴニストの投与だけでなく、そのポリペプチドの各種臓器をターゲットとした本発明のポリペプチドや抗体投与や、そのポリペプチドをコードする遺伝子に対するアンチセンス核酸や同遺伝子配列情報を基に合成した短い 2 重鎖 RNA (RNAi) の投与、あるいは該遺伝子を用いた遺伝子治療に応用することもできる。この場合には本発明のポリペプチドをコードする塩基配列は、本発明のポリペプチドの各種臓器に関わる疾患の患者の遺伝子欠失や変異の有無を調べるために必要な情報であり、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子は、本発明のポリペプチドの機能不全に関与する疾患の予防あるいは治療薬や診断薬に応用することができる。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は、材料及びスクリーニング方法を今までと全く異なるものを使用することにより鋭意研究を重ねた結果、マウス胎児尾芽由来の cDNA ライブラリーから、ヒト KIAA

0620遺伝子に高いホモロジーを示す遺伝子(DNA)をクローニングし、その遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列とヒトKIAA0620遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列とでは約91.88%のホモロジーを示す全く新しい1,746アミノ酸長配列であること、また、得られた遺伝子が個体発生時の血管形成時期の初期から血管形成時期全般を通して血管特異的に発現し、成長後の成体では胃・重層扁平上皮に於いて強い発現、子宮に於いてやや強い発現が、また、脳をはじめとした各種臓器に於いて発現が認められることを見出した。

【0011】

また、マウスES細胞を用いた血管形成をモデル化した実験系を用い、血管形成初期の内皮細胞の誕生及びその増殖に関わる遺伝子を網羅的に取得することを可能とする実験系(文献:2,3,14)を使用することによって、今回初めて、血管形成に関わる4,000塩基長以上の齧歯類、とりわけマウス由来の長大な遺伝子として本発明の遺伝子を見出した。

【0012】

更に、得られた遺伝子情報を解析することにより、本発明のポリペプチド配列は、Plexinファミリーに特徴的なドメインが存在することを発見し、それらのドメインが血管形成時の、あるいは各種組織を構成する細胞の増殖・分化、ガイダンスといった重要な機能に係わっていることを示し、更にその遺伝子情報をもとに新規ポリペプチドとそれに特異的な抗体を得て、本発明を完成するに至った。

【0013】

即ち、本発明は第一の態様として、以下の(a)又は(b)のポリペプチドをコードする塩基配列から成るDNA:(a)配列番号:1又は配列番号:15で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列の一部(例えば、以下に示す新規Plexinファミリー様のもの、配列番号1で示されるアミノ酸配列において2番目(メチオニン)~1,746番目(アラニン)の1,745個のアミノ酸から成るポリペプチド、又は、配列番号15で示されるアミノ酸配列において2番目(メチオニン)~1,997番目(アラニン)の1,996個のアミノ酸から成るポリペプチド)又は全部から成るポリペプチド;又は(b)配列番号:1又は配列番号:15で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列から成り、(a)のポリペプチドの一部又は全部と実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチドに係る。

本発明の第二の態様として、以下の(a)、(b)又は(c)のDNA:(a)配列番号:2で示される塩基配列において、配列番号:1で示されるアミノ酸配列(配列番号:2の塩基対第3~5,240番目の5,238塩基対長)又は配列番号:15で示されるアミノ酸配列(配列番号:16の塩基対第3~5,993番目の5,991塩基対長)、及びそれらの一部(例えば、以下に示す新規Plexin配列に認められるモチーフの少なくとも一つを有するもの、又は、配列番号1で示されるアミノ酸配列において2番目(メチオニン)~1,746番目(アラニン)の1,745個のアミノ酸から成るポリペプチド、又は配列番号15で示されるアミノ酸配列において2番目(メチオニン)~1,997番目(アラニン)の1,996個のアミノ酸から成るポリペプチド)又は全部をコードするDNA;(b)

(a)のDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA;又は(c)(a)のDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、(a)のポリペプチドの一部又は全部と実質的に同質の生物学的活性を有する蛋白質をコードするDNAに係る。

以上の本発明の第一及び第二の態様であるDNAをまとめて、以下、「本発明のDNA」ともいう。本発明のDNAは、新規ポリペプチドをコードするものである。又、本発明はこれらDNAを含む、ラット、マウスあるいはハムスター等の齧歯類由来遺伝子、特にマウス遺伝子にも係る。特に、このようなマウス遺伝子は「マウスKIAA0620遺伝子」ともいう。

更に、本発明は本発明のDNA又は遺伝子(以下、「KIAA0620遺伝子」ともいう。)にコードされるポリペプチド(以下、「本発明のポリペプチド」ともいう。)、例えば、本

発明のDNA又は遺伝子を導入した宿主細胞で作製される組換え蛋白質であるポリペプチド（以下、「KIAA0620蛋白質」ともいう）に係る。それらは齧歯類における個体発生時の血管内皮細胞(Flk-1陽性細胞：文献1, 10, 12, 14)あるいは血管内皮細胞の前駆細胞から血管内皮細胞に分化する途中の細胞の新規な分子マーカーとして使用可能で有用である。

また、本発明は、本発明のDNA又は遺伝子を含む組換えベクター、及び、本発明のポリペプチド若しくはその部分ペプチド（例えば、以下の実施例に示すような、C-末端領域にある数個数十個のアミノ酸配列からなるポリペプチド）、又は該ポリペプチドを含む組換え蛋白質を又はそれらの塩に特異的に結合する抗体に係る。

【0014】

また、本発明のDNA、遺伝子、ポリペプチド若しくは組換え蛋白質、又は抗体を用いることによって、本発明のポリペプチドや組換え蛋白質と特異的に結合する物質（リガンド）やリガンド阻害因子、該蛋白質の発現量を変化させる化合物、該蛋白質に結合する蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）のスクリーニング方法、該スクリーニング用キットを提供する。

【0015】

更に、本発明の組換えベクターを導入した遺伝子導入細胞、又は遺伝子導入動物を作製し、in vitroまたはin vivo病態モデルを提供する。

【0016】

更に、本発明のDNA、遺伝子、ポリペプチド若しくは組換え蛋白質を、組換え動物若しくは組換え動物細胞、又は、抗体を用いた、血管増殖分化制御因子、あるいは制御化合物（合成化合物を含む）のスクリーニング方法、及び該スクリーニング用の各種キットを提供する。

即ち、本発明のDNA又は遺伝子を用いた、血管増殖分化制御因子又は制御化合物のスクリーニング方法、及び该方法に用いる遺伝子発現測定キット；本発明のポリペプチド若しくは組換え蛋白質を用いて作製した蛋白質相互作用検出系又はアゴニスト・アンタゴニスト・生体内リガンド検索系に基づく、血管増殖分化制御因子又は制御化合物のスクリーニング方法、及び方法に用いるポリペプチド結合物質測定キット；組換え動物若しくは組換え動物細胞を用いた、血管増殖分化制御因子又は制御化合物のスクリーニング方法、及び该方法に用いる血管増殖分化制御活性測定キット；更に、本発明の抗体を用いて作製した蛋白質相互作用検出系、アゴニスト・アンタゴニスト・生体内リガンド検索系に基づく、血管増殖分化制御因子又は制御化合物のスクリーニング方法、及び该方法に用いる抗体力測定キット等も提供する。

【0017】

更に、本発明は、本発明のDNA、本発明のDNAを含有する組換えベクター又は発現ベクター、該ベクターを保持する形質転換体、該形質転換体を培養し、本発明のポリペプチドの一部あるいは全長のポリペプチドを含む組換え蛋白質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする、本発明のポリペプチド若しくは該ポリペプチドを含む組換え蛋白質、又はその塩の製造方法、及び、こうして得られる本発明のポリペプチドの一部あるいは全長のポリペプチドを含む組換え蛋白質またはその塩を提供する。又、本発明は、本発明のDNAを含有してなる医薬、本発明のポリペプチド若しくはその部分ペプチド又は該ポリペプチドを含む組換え蛋白質をコードするDNAに実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスヌクレオチド、又はそれらを含有してなる医薬、本発明のDNAの配列情報を基に合成した短い2重鎖RNA(RNAi)又はそれらを含有してなる医薬、本発明のポリペプチド若しくはその部分ペプチド又は該ポリペプチドを含む組換え蛋白質を含有してなる医薬を提供する。

【0018】

更に、本発明は、本発明DNA、本発明ポリペプチド、その部分ポリペプチド若しくは該ポリペプチドを含む組換え蛋白質、又は、本発明のDNA又は遺伝子に対する抗体を網羅的に作成し、それらを集積させて得られる、所謂、DNAチップ（アレイ）、プロテインチップにも係る。

【発明の効果】**【0019】**

今回、本発明者はマウス胎児尾芽由来のcDNAライブラリーを使用し、特別なスクリーニング法を適用することにより、今までに取得不可能であったヒトKIAA0620遺伝子に高いホモロジーを示す遺伝子(DNA)をクローニングし、新規PlexinポリペプチドをコードするDNA配列を取得することに成功した。その新規DNA配列にコードされるポリペプチドは、1,746アミノ酸長又は1,997アミノ酸長であり、また、そのポリペプチドは、Semaphorin/CD100 antigenドメイン、3つのPlexin/Semaphorin/integrinドメイン、及び3つのCell surface receptor IPT/TIGを有し、かつC-末端側に膜貫通(TM)セグメントが存在する今までにない構成であり、血管内皮細胞の増殖、分化あるいは機能の発現といった細胞の重要なプロセスに関係することが推定された。

【0020】

更に本発明の遺伝子配列は、個体発生時の血管形成時期の初期から血管形成時期全般を通して血管特異的に発現し、成長後の成体では胃・重層扁平上皮に於いて強い発現、子宮に於いてやや強い発現が、また脳をはじめとする各種臓器に於いて発現していることが今回初めて見出され、本発明の遺伝子がコードするポリペプチドが血管新生において、あるいは脳をはじめとする各種臓器において、発育、機能保全、更に各種臓器における血管新生が関係する疾患に関わる重要な働きに関わっている可能性が示された。

【発明を実施するための最良の形態】**【0021】**

本発明のDNAは、本発明者により採取されたマウス胎児尾芽由来mRNAを出発材料として、本発明者が調製したcDNAライブラリーから、cDNA断片として単離した後に、塩基配列を決定し同定したものである。即ち、具体的には、(DNA Research, 2002, 9:47-57、及び Nucleic Acids Res., 29, e22 (2001))に従って調製したマウス胎児尾芽由来のcDNAライブラリーから、約16,608個の組換え体を選択し、その全ての3'末端DNA配列を決定し、その中から、ヒトKIAA0620遺伝子に高い相同性を有するクローンを選択し全塩基配列の決定を行なった。次に、こうして得られた全塩基配列に基づき、DNA解析プログラム(GCG, Fasta& Blast)を用いてホモロジー検索を行ない、その困難性から今までに取得され得なかった本発明のDNAを鋭意検討の結果、ようやく取得するに至った。

【0022】

すなわち、マウス胎児尾芽由来cDNAライブラリーに対し、ヒト長鎖cDNA(KIAA0620)にホモロジーを有する遺伝子取得を試みたところ、驚くべきことにヒトKIAA0620遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列とアミノ酸配列レベルで約91.88%のホモロジーを示す全く新しい1,746アミノ酸長配列(配列番号:1)を有する新規ポリペプチド(本発明のポリペプチド)をコードする新規遺伝子を含む塩基配列(配列番号:2)を有するクローン(クローン名:mpf00920)を取得することに成功した。

【0023】

本発明の配列番号1で示されるアミノ酸配列(1,746アミノ酸長)の1番目から1,746番目までのアミノ酸配列(1,746アミノ酸長)は、ヒトKIAA0620遺伝子がコードするアミノ酸配列(1,985アミノ酸長)のほぼ全長に近い配列(238番目から1,985番目までの1,748アミノ酸長)に対して約91.88%という有意な相同性を有する。

【0024】

本発明により得られた上記のアミノ酸配列について、以下の実施例に記載したように、公共のデータベースを用いてホモロジー検索を行った結果、今までに出願された2つの配列に対して「本発明のポリペプチド」の配列の全長1,746アミノ酸長について約91.70%及び約91.51%という比較的高いホモロジーが認められた。しかし、それらはヒト由来配列であり、ヒト病態の解明に重要なモデル動物である齧歯類、とりわけマウスに於けるヒトKIAA0620遺伝子に対応する遺伝子は本発明により初めて取得され、同遺伝子がコードする「本発明のポリペプチド」配列の解明により、ようやく新規配列蛋白とその機能を述べることが可能となった。

【0025】

尚、配列番号：2に示される塩基配列を有する本発明のDNAを含むプラスミド（プラスミド表示名：mpf00920）は、茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに平成15年9月10日付けで寄託され、受託番号FERM P-19518が付されている。

【0026】

ヒトKIAA0620遺伝子の配列は6,754塩基対長であり、コードされているポリペプチドのアミノ酸配列の長さは1,985アミノ酸である（DNA Research, 1998, 5:169-176, <http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA0620/>, NCBI-GenBank Accession No. AB014520）。ヒトKIAA0620遺伝子ホモログを詳細に研究することにより、N-末端側にはさらにポリペプチドがコードされている可能性について検証される可能性がある。本発明の配列番号2に示されるDNAにコードされているポリペプチドのアミノ酸配列の長さは1,746アミノ酸であるが、本発明のDNAに対するホモログについて更に詳細に研究することにより、N-末端側に更に伸張してポリペプチドがコードされていることを見つける可能性がある。

【0027】

尚、当業者であれば、本明細書によって初めて開示された配列番号：2に示した塩基配列に基づいてクローンの5'側に適当なプライマー（例えば、配列番号：2の塩基対第61～80番目5'-CGCCTACCTCGGGCACCGGG-3に対応させて合成した配列5'-CCCGGTGCCCGAGGTAGGCG-3'）を調製し、該プライマーと市販されている齧歯類由来のmRNA、あるいは齧歯類由来組織から調製したmRNAとハイブリダイゼーションを行なった後に逆転写反応を行なうことにより本発明のDNAの上流側（遺伝子の5'側）の領域を含む新たなcDNA断片を特異的に合成することができる。合成した5'側の領域を含む新たなcDNA断片をプラスミドに挿入した後、配列番号2の一部分をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションのような相同性クローニングによって、本発明のDNAを含む齧歯類由来KIAA0620遺伝子の全領域を調製することが可能である。あるいは他の方法、例えば、本発明のDNAをプローブとして用いれば、コロニーハイブリダイゼーションのような相同性クローニングによって、マウスを含めた各種齧歯類由来KIAA0620遺伝子の5'末端領域を調製することができる。

【0028】

実際には、本発明者は、長鎖cDNAといった対象テキスト配列が長い材料を哺乳動物のゲノム配列を高速検索することを可能にするために、特開2003-216615号公報に基づくメモリに比較回路を付加した

content addressable memory (CAM) を用いた配列の長さに計算時間が依存しない並列比較可能な計算機（ハードウェア）開発とその制御アルゴリズム設計を鋭意研究することにより、超並列ゲノムコンパレータといった改良された新規システムを構築して、長鎖cDNAを対象とした解析方法を完成した。完成した超並列ゲノムコンパレータを使用し、公開済みのマウスゲノム配列からマウスmKIAA0620に対する大規模・高速塩基配列検索を実施し、公開済みのマウスゲノム配列のなかからmKIAA0620塩基配列に対し付加する配列に関わる情報を検索し、本発明の配列番号1に示したアミノ酸配列のN末側に新たに付加されるアミノ酸配列を取得するために必要なプライマー配列を設計するに至った。それらプライマーを使用して5'

RACE等のPCR法を使用することによって、本明細書の実施例に具体的に記載したように、N末側に新たに付加される251個の新たなアミノ酸配列を決定することができた。

【0029】

本発明のDNAとしては、前述した本発明のポリペプチドをコードする塩基配列から成るものであればいかなるものであってもよい。各種齧歯類由来の各種臓器、例えば、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、胸腺、筋肉、骨髄等、あるいは発生の各段階の各種組織・細胞に由来するcDNAライブラリー等から同定・単離されたcDNA、又は、合

成DNAのいずれでもよい。ライブラリー作成に使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織、あるいはそれらの細胞質よりtotal RNA画分またはmRNA画分を調製したものをを用いて、直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、「RT-PCR法」と略称する)によって増幅することもできる。

【0030】

配列番号: 1又は配列番号: 15で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号: 1又は配列番号: 15で示される全アミノ酸配列との相同性の程度が、全体の平均で約92.5%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上であるアミノ酸配列を意味する。従って、本発明の配列番号: 1又は配列番号: 15で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列から成るポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号: 1又は配列番号: 15で示されるアミノ酸配列に対して上記の相同性を有し、配列番号: 1又は配列番号: 15で示されるアミノ酸配列から成るポリペプチドと実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチドを挙げることができる。ここで、実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。又、本発明のポリペプチドには、例えば、配列番号: 1又は配列番号: 15で示されるアミノ酸配列中において、一部（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列、或いはそれらを組み合わせたアミノ酸配列から成り、配列番号: 1又は配列番号: 15で示されるアミノ酸配列から成るポリペプチドと実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチドも含まれる。

【0031】

更に、本発明のDNAは、例えば、配列番号: 2又は配列番号16で示される塩基配列において、配列番号: 1又は配列番号: 15で示されるアミノ酸配列をコードするDNA、又は、該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、好ましくは更に配列番号: 1又は配列番号: 15で示されるアミノ酸配列から成るポリペプチドと同質の生物学的活性を有するポリペプチド（蛋白質）をコードするDNAであればいずれのものでもよい。かかる条件下で、配列番号: 2又は配列番号: 16で示される塩基配列において、配列番号: 1又は配列番号: 15で示されるアミノ酸配列をコードするDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、該DNAの全塩基配列との相同性の程度が、全体の平均で、約87.5%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上である塩基配列を含むDNA等を挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular cloning third.ed. (Cold Spring Harbor Lab.Press, 2001)に記載の方法等、当業界で公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。ここで、「ストリンジェントな条件」とは、例えば、DIG DNA Labeling (ペーリンガー・マンハイム社製Cat No. 1175033)でプローブをラベルした場合に、32℃のDIG Easy Hyb溶液(ペーリンガー・マンハイム社製Cat No. 1603558)中でハイブリダイズさせ、40℃の0.1xSSC溶液(0.1%[w/v]SDSを含む)中でメンブレンを洗浄する条件(1xSSCは0.15MNaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウムである)でのサザンブロットハイブリダイゼーションで本発明ヒトDNAプローブにハイブリダイズする程度の条件である。

【0.0.3.2】

本発明のDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分等の適当な塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、Molecular cloning third.ed. (Cold Spring Harbor Lab.Press, 2001)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例え

ば、SuperScript II逆転写酵素キット（ギブコBRL社）等を用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

【0033】

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、当該技術分野で公知の方法に従って作成することができる。例えば、(1)本発明のDNA又は本発明のDNAを含む細菌類由来遺伝子を含有するDNA断片を切り出し、(2)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC18, pUC118）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19, pSH15）、 λ ファージなどのバクテリオファージ、あるいはSV40、CMVウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、ウシパピローマウイルスなどの動物ウイルス由来配列を使用した発現ベクター等を利用することができる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応した適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、宿主が大腸菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーター、あるいはそれらプロモーターを組み合わせまたは複合させたプロモーターなどが、宿主が枯草菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーター、HSPプロモーター、メタロチオネインプロモーターなどが挙げられる。

【0034】

発現ベクターには、以上の他に、所望により当該技術分野で公知の、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）等を付加することができる。また、必要に応じて、本発明のDNAにコードされた蛋白質を他の蛋白質（例えば、グルタチオンSトランスフェラーゼ、ヒスチジンタグ、カルモデュリンバインディング蛋白質、及びプロテインA等）との融合蛋白質として発現させることも可能である。このような融合蛋白質は、適当なプロテアーゼを使用して切断し、それぞれの蛋白質に分離することができる。

【0035】

更に、組換え動物細胞を作成することを目的とした動物細胞をターゲットとした遺伝子導入用発現ベクターには、以上の他に、所望により当該技術分野で公知の、Bluescript SK(+/-)ベクターを鋳型に血管内皮細胞特異的発現を目的にしたTie2プロモーター（血管内皮細胞特異的プロモーター）を連結したものを利用するとよい。それら発現ベクターとプロモーターを使用することで血管内皮細胞特異的発現が可能となる。或いは、Gateway（商標）クローニングテクノロジー（Invitrogen:Cat.No.11821-014）として知られているクローニングシステムを利用することも出来る。

【0036】

宿主細胞としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12由来のDH1（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160(1968)), JM103（Nucleic Acids Research, 9巻, 309(1981)), JA221（Journal of Molecular Biology, 120巻, 517(1978)), 及びHB101（Journal of Molecular Biology, 41巻, 459(1969)), あるいはエシ

エリヒア・コリ (*Escherichia coli*) B株等が用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 (Gene, 24巻, 255(1983)), 207-21 [Journal of Biochemistry, 95巻, 87(1984)] 等が用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) 等が用いられる。動物細胞としては、例えば、サル腎臓細胞由来COS-1, COS-7, Vero細胞, チャイニーズハムスターCHO細胞 (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO(dhfr-)細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3細胞, HEK293T細胞、ヒトFL細胞、ヒトHeLa細胞あるいはヒトミエローマ細胞などが用いられる。

【0037】

また、組換え動物細胞を作成することを目的とした動物細胞をターゲットとした遺伝子導入用の細胞としては例えば、培養マウスES細胞、マウス受精卵、マウスNIH3T3細胞株、ヒト胎仔腎細胞由来293細胞株などが用いられる。

【0038】

これら宿主細胞の形質転換は、当該技術分野で公知の方法に従って行うことができる。例えば、以下に記載の文献を参照することができる。Proc. Natl. Acad. Sci. USA (69巻、2110-、1972)、Gene (17巻、107-、1982)、Molecular & General Genetics (168巻、p111-、1979)、Methods in Enzymology (194巻、p182-187、1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (75巻、1929-、1978)、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル (p263-267、1995、秀潤社発行)、及びVirology (52巻、456-、1973)。

【0039】

更に、遺伝子導入動物の形質転換を目的とした宿主動物細胞の形質転換は、当該技術分野で公知の方法に従って行うことができる。例えば、以下に記載の文献を参照することができる。Proc. Natl. Acad. Sci. USA (77巻、p7380-7384、1980)、別冊実験医学・ジーンターゲイングの最新技術 (p34-41、2000、羊土社発行)、マウス操作マニュアル第二版 (p225-252、p279-285、1994、近代出版発行)、増刊実験医学・発生工学実験法 (全196頁、1994、羊土社発行)、及びTrend in Genetics (5巻、p70-76、1989)。

【0040】

具体的には、トランスジェニックマウス作製においては、マイクロインジェクション法を用いる。採卵用のマウス (マウス系統C57BL/6、C3H, BDF1) に妊馬血清 (5単位) の腹腔内投与、その48時間後ヒト絨毛性ゴナドトロピン (5単位) の腹腔内投与を行い、排卵誘発を行う。ホルモン注射後14時間後に排卵が起こるので、その間に雄マウスと交尾させる。雌の膣栓の有無で交尾の確認後に雌マウスを屠殺し、卵管膨大部から受精卵を採取する。採取した受精卵は、培養液の入ったペトリ皿に移し、顕微鏡下でマイクロマニピュレーターを用いて受精卵の前核中に目的遺伝子を注入する。目的遺伝子注入後、生き残った受精卵は、偽妊娠マウスの卵管内に移入する。受精卵移入後、約20日後に新生仔 (トランスジェニックマウス) が得られる。

【0041】

また、ノックアウトマウス作製には、培養マウスES細胞に電気穿孔法で目的遺伝子を導入し、標的遺伝子相同組換えを起こした細胞を選択した後に、このES細胞を他の胚盤胞内に注入したものを仮親の卵管内へ移入し、キメラマウスを作製する。この方法では、まず遺伝子導入されていないES細胞または導入されているがランダムに入ったES細胞から相同組換えを起こしたES細胞を選別する必要がある、このための選択マーカー遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子を利用する。この遺伝子は相同領域間に挿入する。相同組換えの成否は、サザンブロット法とPCR法でDNA断片が検出できるか確認する。あ

るいは、他の手法としてポジティブ・ネガティブ選択法が利用できる。この場合には前者と異なり、ネオマイシン耐性遺伝子にプロモーターを付加する必要がある。ランダムに組み込んだ細胞との選別のため、第二の選択マーカー遺伝子として、ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子やジフテリア毒素フラグメントA遺伝子を利用する。標的遺伝子の相同組換え細胞以外はガンシクロビル添加またはジフテリア毒素フラグメントAの発現により殺すことが可能である。培養10日目程度でコロニーが明瞭になれば、サザンブロット法またはPCR法で相同組換えを起こしたクローンを同定する。同定したES細胞クローンは、レシピエントの胚盤胞中にマイクロインジェクションで注入後、仮親の子宮内へ移入する。移入後、約20日後に新生仔（生殖キメラマウス）が得られる。

【0042】

このようにして得られた、本発明のDNAを含む齧歯類由来遺伝子を含む発現ベクターで形質転換された形質転換体は、当該技術分野で公知の方法に従って培養することができる。例えば、宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常、約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培養は通常、pH約5～8に調整された培地を用いて約20～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加えることもできる。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、pHは約6～8に調整された培地を用いて、通常約30～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加えることもできる。

【0043】

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により蛋白質の粗抽出液を得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる蛋白質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。こうして得られた本発明のポリペプチド（蛋白質）は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。更に、組換え体が産生する蛋白質を、精製前または精製後に、メチオニンアミノペプチダーゼを用いてN-末端メチオニンを除去したり、ミリスチル転移酵素を用いてN-末端アミノ酸のミリスチル化を行ったり、アセチルトランスフェラーゼを用いてN-末端アミノ酸のアセチル化を行ったり、或いはその他の修飾酵素を用いることにより任意にアミノ酸の修飾を行うことができる。又、C-末端を修飾するプロセシングカルボキシルペプチダーゼ、C-末端アミド化酵素等を作用させてC-末端アミノ酸を修飾することもできる。更に、トリプシン、キモトリプシン、FactorXa、トロンピン、又は、KEX2プロテアーゼのような適当な蛋白限定分解酵素を作用させることにより、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。

融合蛋白質として産生させた場合には、適当な蛋白質限定分解酵素を用いて不必要なポリペプチド部分を除去することもできる。

本発明ポリペプチド（蛋白質）又はその塩の存在は、様々な結合アッセイ及び特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイ等により測定することができる。

【0044】

本発明のポリペプチド（蛋白質）は、C-末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO⁻）であるが、C-末端がアミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）であってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC1-6アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC3-8シクロアルキル基、例えば、フ

エニル、 α -ナフチルなどのC6-12アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C1-2アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C1-2アルキル基などのC7-14アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルエステルなどが用いられる。

【0045】

本発明のポリペプチド（その存在状態は蛋白質である）がC-末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC-末端のエステルなどが用いられる。さらに、本発明の蛋白質には、N-末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN-末端のグルタミン酸残基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上にある、例えばOH、COOH、NH₂、SHなどが適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

【0046】

本発明のポリペプチドの一部からなるペプチドとしては、前記した本発明のポリペプチド（その存在状態は蛋白質である）の部分ペプチドであって、実質的に同質の活性を有するものであればいずれのものでもよい。例えば、本発明のポリペプチド（蛋白質）の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有し、例えば、本発明の組換え蛋白質と実質的に同質の生物学的活性を有するペプチドなどが用いられる。このような部分ペプチドの具体例としては、配列番号：1で示されるアミノ酸配列の中の、新規Plexinに特徴的なモチーフを含むもの、又は、配列番号1で示されるアミノ酸配列において2番目（メチオニン）～1,746番目（アラニン）の1,745個のアミノ酸から成るポリペプチドを挙げることができる。又、本発明の部分ペプチドはC-末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO⁻）であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）であってもよい。さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明の蛋白質と同様に、N-末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N-末端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

【0047】

本発明のポリペプチド（その存在状態は蛋白質である）又はその一部からなるペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0048】

本発明のポリペプチド（その存在状態は蛋白質である）、その一部からなるペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体は、当該技術分野で公知の化学合成方法を用いて調製することもできる。例えば、通常市販されている蛋白質合成用樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、当業界において自公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、例えば、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、及びN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドのよう

なカルボジイミド類に代表される蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対照とする酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0049】

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、酸アミド類、ハロゲン化炭化水素類、アルコール類、スルオキシド類、及びエーテル類等、当業界において蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。原料の各アミノ基、カルボキシ基、及びセリン水酸基等の保護基としても、当該技術分野において、通常使用される基を使用することができる。原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

【0050】

本発明の一部からなるペプチドまたはそれらの塩は、当該技術分野において自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質を適当な蛋白質限定分解酵素で切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(1)～(3)に記載された方法が挙げられる。

- (1) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
 - (2) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座1、蛋白質の化学IV、205、(1977年)
 - (3) 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店。
- 又は、一部からなるペプチドは、例えば、C-末端から十数残基の配列或いは配列番号: 1で示されるアミノ酸配列の任意の場所の十数残基の部分で公知のペプチド合成装置等を用いて合成することができる。更に、このような部分ペプチドは例えば約50から500アミノ酸長までの長さの適当な部位のポリペプチド、または約500アミノ酸長から全長までの長さの適当な場部位のポリペプチドを選択して、組換え蛋白質として前述の遺伝子組換え技術を用いて製造しても良い。

【0051】

反応後の精製も自体公知の方法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0052】

本発明のポリペプチド（その存在状態は蛋白質である）、その一部からなるペプチドまたはそれらの塩と特異的に結合する抗体は、それらを特異的に認識し得るものであれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明のポリペプチド（蛋白質）、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のポリペプチド（蛋白質）又はその部分ペプチドを抗原として用い、当業者に公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。このように免疫原として使用できる部分ペプチドの例として、本明細書の実施例に具体的に記載されているように、配列番号1に示される本発明ポリペプチドのC末端領域における十数個～100個程度の連続したアミノ酸から成るペプチドを挙げることができる。

【0053】

例えば、ポリクローナル抗体の場合には、上記抗原を単独、又は、セルロース、重合アミノ酸、アルブミン及びキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) 等の適当な担体に結合させて、アジュバントの存在又は非存在下で、例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ウマなどの適当な動物に対して免疫誘導することによって容易に得ることができる。ポリクローナル抗体は免疫された動物の血清から公知の様々な方法によって回収及び精製することができる。

【0054】

一方、モノクローナル抗体を製造するためには、例えば、上記の免疫された動物から抗体産生細胞 (例えば、脾臓又はリンパ節由来) を回収し、公知の不活化増殖細胞 (例えば、マウスミエローマ株P3X63Ag8 株やそれ由来のSp2/OAg-14 等、あるいはラットミエローマ株Y3-Ag1.2.3, YB2/0, IR983F 等の骨髓腫細胞株) との細胞融合により、ハイブリドーマを作成する。これを更にクローニングし、本発明のポリペプチド等に特異的に認識する抗体を生産しているハイブリドーマのクローンを選別し、該ハイブリドーマの培養液からモノクローナル抗体を回収し精製することによって容易に得ることができる。

【0055】

尚、合成ペプチドに対する抗体の作製と抗体の精製に関する参考文献として、例えば、新細胞工学実験プロトコル、東大医科学研究所制癌研究部編、秀潤社、1993年、2-22, 合成ペプチドに対する抗体の作製、p 210-217を挙げるができる。

【0056】

更に、当業者には公知である様々な遺伝子工学的手法により、こうして得られた抗体の抗原決定基等を含む、ヒト化抗体等の各種キメラ抗体も容易に製造することができる。本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のポリペプチド (蛋白質) 等を検出するために使用することができる。また、これらを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のポリペプチド (蛋白質) の検出、被検細胞内における本発明のポリペプチド (蛋白質) の挙動の分析などのために使用することができる。

。

【0057】

更に、本発明の抗体は、公知の方法による被検液中の本発明のポリペプチド (蛋白質) 等の定量、特に、モノクローナル抗体を使用したサンドイッチ免疫測定法による定量、及び組織染色等による検出などに使用することができる。それによって、例えば、本発明のポリペプチド (蛋白質) 等が関与する疾病の診断を行なうことができる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる本発明の蛋白質等の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量 (例えば、蛋白質量) に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、当該技術分野で公知の、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などを用いることができる。

【0058】

これらの測定・検出方法に関する一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、[Methods in ENZYMOLOGY] Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書Vol. 73(Immunochemical Techniques(PartB))、同書Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and Genera

l Immunoassay Methods)), 同書Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)、また、個体発生の実験法を含め発生工学的実験法は、別冊実験医学・ジーンターゲインの最新技術(p 344-41、2000、羊土社発行)、マウス操作マニュアル第二版(p 225-252、p 279-285、1994、近代出版発行、増刊実験医学・発生工学実験法(全196頁、1994、羊土社発行などを参照することができる。

【0059】

本発明のポリペプチド(蛋白質)又はその一部分からなるペプチドをコードするDNAに実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンス核酸としては、当該DNAの塩基配列に実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンス核酸であってもよい。実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列の全塩基配列または部分塩基配列と約95%以上、最も好ましくは100%の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。又、これらアンチセンス核酸と同様の作用を有する核酸配列(DNA、RNAまたはそれら核酸の修飾体)も本発明でいうアンチセンス核酸に含まれる。また、当該DNAの塩基配列情報を基に合成した短い2重鎖RNA(RNAi)についても、公知の核酸合成装置などを用いて製造することができる。

【0060】

更に、本発明のポリペプチド(蛋白質)等は、これら物質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。すなわち、本発明は、本発明のポリペプチド(蛋白質)、その一部からなるペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする、該物質又はそれらの塩の活性を阻害する化合物(以下、「阻害剤」ともいう)のスクリーニング方法、及びその為のスクリーニング用キットを提供する。本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチド(蛋白質)等の生物学的活性を阻害する化合物である。該化合物またはその塩は、本発明の蛋白質等の活性を直接阻害するものであってもよいし、本発明のポリペプチド(蛋白質)等の発現を阻害することによって間接的に本発明のポリペプチド(蛋白質)等の活性を阻害するものであってもよい。該化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などがあげられる。本発明のポリペプチド(蛋白質)等の生物学的活性を阻害する化合物も上記各種疾病に対する治療・予防剤などの医薬として使用できる可能性がある。

【0061】

本発明のDNA及び該DNAを含む齧歯類由来遺伝子をプローブとして使用することにより、マウスはもとより齧歯類、更にヒトにおける本発明のポリペプチド又はその一部分からなるペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(Genomics, 第5巻, 874~879頁(1989年)、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第86巻, 2766~2770頁(1989年))などにより実施することができる。更に、本発明の相同遺伝子であるヒトKIAA0620遺伝子に異常があったり、欠損している場合あるいは発現量が減少している場合、生体内において正常な機能を発揮できない患者に対しては、公知手段に従って(1)レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクターなどの適当なベクターをベヒクルとして使用する遺伝子治療によって、本発明のDNA又はヒト由来遺伝子を該患者体内に導入し、発現させるか、又は(2)本発明のポリペプチド(蛋白質)あるいはヒト由来ポリペプチド(蛋白質)又は本発明の抗体を該患者に注入すること等によって、該患者において本

発明の蛋白質等の機能を発揮させることができるものと考えられる。前者の場合、本発明のDNA又はヒト由来遺伝子を適当なベクターをベヒクルとして使用し、ベクターにのせた形の該DNAを単独、又は、摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することも可能である。

【0062】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC - IUBCommision on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

【0063】

本願明細書の配列表中で、以下の配列番号は以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕本発明のポリペプチドのアミノ酸配列（アミノ酸数：1,746）を示す。

〔配列番号：2〕配列番号：1で示されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を含む、クローンmpf00920の全塩基配列（6,178塩基対）を示す。

〔配列番号：15〕配列番号1に示される本発明のポリペプチドのN末端側に更に251個のアミノ酸（配列番号11）が付加されたアミノ酸配列（アミノ酸数：1,997）を示す。

〔配列番号：16〕配列番号：配列番号：15で示されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を含む全塩基配列（6,931塩基対）を示す。

【実施例】

【0064】

以下に、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、実施例における各種遺伝子操作は、Molecular cloning third.ed. (Cold Spring Harbor Lab.Press, 2001)に記載されている方法に従った。

【0065】

(1) マウス胎児尾芽由来cDNAライブラリーの構築

attB1部位を有するオリゴヌクレオチド：5' -FgcGCACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGCGGCCGC(T)₁₈-3' (F、gおよびcは、それぞれフルオレッセイン基、フォスフォロチオエイト修飾G、フォスフォロチオエイト修飾C残基を表す)をプライマーとして、マウス胎児尾芽（ICRマウス受精11.5日目のS1、S0、S-1、及びS-2に関わる前体節中胚葉及び体節中胚葉）由来mRNAを鋳型にSuperScriptII逆転写酵素キット（インビトロジェン社製）で2本鎖cDNAを合成した。これにattB1部位を有するアダプターをcDNAにライゲーションした。その後、アガロースゲルで1kb-2kb、2kb-3kb、3kb-4kb、4kb-5kb、と5kb-7kbにcDNAをサイズ分画した。これらを、サイズを小さくしたattP pSPORT-1エントリーベクター（インビトロジェン社製）にBP反応により移し換えた後、大腸菌ElectoroMax DH10B株（インビトロジェン社製）にエレクトロポレーション法により導入した。プレートに出現した10⁶個以上の形質転換体を集め、液体培地中で、37℃で2-3時間培養した後プラスミドを調製した。スーパーコイルドプラスミドの形でサイズ分画した後、LR反応によりattR pBCデステイネーションベクター（インビトロジェン社製）にcDNAを移し換えた。このプラスミドを精製後、DH10B株にエレクトロポレーション法により導入し、各分画が期待されるサイズになるまで、上記の分画操作を2-3回繰り返した。最後に各分画ごとにDH10B株にプラスミドを導入した。なお、ここで用いた試験管内での相同組み換え反応を利用したクローニングシステムは小原等の方法（Nucreic Acids Res., 29, e22 (2001)およびDNA Research Vol.9, 47-57(2002))に従った。

【0066】

次に、全ての画分に含まれる約16,608個のクローンの3'末端DNA配列を決定した。この中から、ヒトKIAA0620に相溶性が高いクローンのcDNAに関して全塩基配列の決定を行なった。配列決定には、アプライドバイオシステム社製のDNAシーケンサー（ABI PRISM3700）と同社製反応キットを使用した。大部分の配列はショットガンクローンをダイタ

ーミネーター法を用いて決定した。一部の塩基配列については、決定した塩基配列を元に
してオリゴヌクレオチドを合成し、プライマーウォーキング法で決定した。

【0067】

(2) ホモロジー検索による本発明DNAを含むクローンの決定

次に、こうして得られた全塩基配列に基づき、DNA解析プログラム(Fasta & Blast)を用いたホモロジー検索を実施したところ、公開されているデータベースの中のヒトKIAA0620遺伝子と高いホモロジーを示す候補クローンmpf00920が見出された。更に、別のDNA解析プログラム(BESTFIT)を用いて、このクローンmpf00920とヒトKIAA0620のアミノ酸配列と塩基配列について比較したところ、アミノ酸配列のレベルでは、ヒトKIAA0620遺伝子がコードするアミノ酸配列(1,985アミノ酸長)の238番目から1,985番目(1,748アミノ酸長)と本発明の配列番号: 1で示されるアミノ酸配列(1,746アミノ酸長)の1番目から1,746番目までアミノ酸配列(1,746アミノ酸長)について、約91.88%のホモロジーを示すことが判明した。また、本発明の配列番号: 1で示されるアミノ酸配列(1,746アミノ酸長)の974番目から975番目の間に、ヒトKIAA0620遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列では、2つのアミノ酸、すなわちバリン及びアラニン(V,A)の挿入が認められることが判明した。

【0068】

公開されたポリペプチドのアミノ酸配列に関するデータベースを検索すると、複数の報告があったが、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列と同じ配列についての報告はなかった。詳しくには、次に示す公開されたポリペプチドのアミノ酸配列に対し、本発明のmpf00920ポリペプチドのアミノ酸配列(1,746アミノ酸長)と、比較的高いホモロジーを示す配列が2件認められるが、実質的に同一である配列はない。

【0069】

1) 国際公開番号W0200114420-A2(発明の名称: Human Plexin-D1, Applicant: Hyseq INC., Publication date: 11, Oct. 2001)のHuman Plexin-D1(1,925アミノ酸長)の178番目から1,925番目の1,748アミノ酸長のアミノ酸配列と、本発明のmpf00920蛋白質(1,746アミノ酸長)の1番目から1,746番目の1,746アミノ酸長のアミノ酸配列とで、比較的高いホモロジーが認められた(約91.70%)。W0200114420-A2のHuman Plexin-D1(1,925アミノ酸長)はヒト由来であり、ポリペプチド断片のアミノ酸配列について診断用蛋白質、治療用あるいはバイオ医薬用として記載されているが、その機能については不明である。相同する1,925アミノ酸長のアミノ酸配列に対し、本発明のマウス由来の1,746アミノ酸配列は、新規配列でありかつ機能についても記載可能で有用である。

【0070】

2) 国際公開番号W0200157188-A2(発明の名称: Human plexin-B1/SEP receptor homologue, SEQ ID NO:2079, Applicant: Hyseq INC., Publication date: 09, Aug. 2001)のHuman Plexin-B1/SEP receptor homologue, SEQ ID NO:2079D1(1,992アミノ酸長)の238番目から1,992番目の1,755アミノ酸長のアミノ酸配列と、本発明のmpf00920蛋白質(1,746アミノ酸長)の1番目から1,746番目の1,746アミノ酸長のアミノ酸配列とで、比較的高いホモロジーが認められた(約91.51%)。W0200157188-A2のHuman Plexin-B1/SEP receptor homologue, SEQ ID NO:2079D1(1,992アミノ酸長)はヒト由来であり、ポリペプチド断片のアミノ酸配列について診断用蛋白質、治療用あるいはバイオ医薬用として記載されているが、その機能については不明である。相同する1,925アミノ酸長のアミノ酸配列に対し、本発明のマウス由来の1,746アミノ酸配列は、新規配列でありかつ機能についても記載可能で有用である。

【0071】

公開された遺伝子の塩基酸配列に関するデータベースを検索すると、本発明のmpf00920塩基配列(6,178塩基長)とホモロジーを有する配列について複数の報告があったが、本発明のmpf00920塩基配列と同じ配列についての報告はなかった。詳しくには、次に示す公開された塩基配列に対し、本発明のmpf00920塩基配列(6,178塩基長)と、やや高いホモロジーを示す配列が4件認められるが、本発明のmpf00920塩基配列(6,178塩基長)と実質的に

同一である配列はない。

【0072】

1) 国際公開番号W0200281745-A2 (発明の名称: Coding sequence SEQ ID 118, downregulated in osteogenesis, Applicant: Aventis Pharma SA., Publication date: 17, Oct. 2002) のCoding sequence SEQ ID 118, downregulated in osteogenesis (6,754塩基長)の710番目から5,958番目までの5,249塩基長と本発明の塩基配列(6,178塩基長)の1番目から5,243番目までの5,243塩基長とで、約86.95%という比較的高いホモロジーが認められた。Coding sequence SEQ ID 118は骨形成時に発現抑制が認められるヒト由来の塩基配列であり、本発明のmpf00920塩基配列(配列番号2:6,178塩基長)に対して比較的高いホモロジーが認められるが、本発明の塩基配列とは異なる配列である。

【0073】

2) 国際公開番号W0200114420-A2 (発明の名称: Human cDNA encoding Plexin-D1, Applicant: Univ. Torino, Univ. California, Publication date: 01, Mar. 2001) Human cDNA encoding Plexin-D1 (5,892塩基長)の542番目から5,790番目までの5,249塩基長と本発明の塩基配列(6,178塩基長)の1番目から5,243番目までの5,243塩基長とで、約86.91%というやや高いホモロジーが認められた。Human Plexin-D1 (6,178塩基長)はヒト由来であり、それがコードするポリペプチド断片のアミノ酸配列について診断用蛋白質、治療用あるいはバイオ医薬用として記載されているが、その機能については不明である。このやや高いホモロジーが認められる6,178塩基長の塩基配列に対し、本発明のマウス由来の6,178塩基長の塩基配列は、新規配列でありかつ機能についても記載可能で有用である。

【0074】

3) 国際公開番号W0200157188-A2 (発明の名称: Human plexin-B1/SEP receptor-encoding cDNA, SEQ ID NO:729, Applicant: HYSEQ INC., Publication date: 09, Aug., 2001) のHuman Plexin-B1/SEP receptor homologue-encoding cDNA, SEQ ID NO:729(7,080塩基長)の配列番号710番目から5,979番目までの5,270塩基長と本発明の塩基配列(6,178塩基長)の配列番号1番目から5,243番目までの5,243塩基長とで、約85.50%というやや高いホモロジーが認められた。Human Plexin-B1/SEP receptor homologue-encoding cDNA, SEQ ID NO:729(7,080塩基長)はヒト由来であり、それがコードするポリペプチド断片のアミノ酸配列について診断用蛋白質、治療用あるいはバイオ医薬用として記載されているが、その機能については不明である。このやや高いホモロジーが認められる7,080塩基長の塩基配列に対し、本発明のマウス由来の6,178塩基長の塩基配列は、新規配列でありかつ機能についても記載可能で有用である。

【0075】

4) 国際公開番号W0200281745-A2 (発明の名称: Coding sequence SEQ ID 43, downregulated in osteogenesis (Applicant: Aventis Pharma SA., Publication date: 17, Oct., 2002) のCoding sequence SEQ ID 43, downregulated in osteogenesis (1,073塩基長)の96番目から1,063番目までの968塩基長と本発明の塩基配列(6,178塩基長)の4,909番目から5,875番目までの967塩基長とで、約99.90%という高いホモロジーが認められた。Coding sequence SEQ ID 43は骨形成時に発現抑制が認められるヒト由来の塩基配列であり、本発明のmpf00920塩基配列(6,178塩基長)に対して高いホモロジーが認められるが1,073塩基長とかなり短く、本発明の塩基配列の3プライム側非コード領域に本発明の塩基配列の一部と相同性を有するのみの配列といえる。

【0076】

1)、2) 及び 3) で出願された配列については、本発明の塩基配列(6,178塩基長)と比較すると、上記に示すようにやや高いホモロジーが認められた。しかし、本発明の遺伝子の配列はやや高いホモロジーが認められるものの全く異なる新規な配列と判断される。また、4) で出願された配列については、本発明の塩基配列すなわちmpf00920遺伝子配列(6,178塩基長)の全長をカバーするものでなく、3プライム側非コード領域に本発明の塩基配列の一部と部分的に高いホモロジーが認められる関係にあり、4) の配列と本発明の遺伝子の配列は、一部分に高いホモロジーが認められるものの全く異なる新規な配列と

判断される。

【0077】

以上のホモロジー検索の結果から、候補クローンmpf00920はヒトKIAA0620遺伝子と比較的高いホモロジーを示し、既にいくつかの報告がある数個の既知遺伝子に類似であるが、全く新しい齧歯類由来の新規遺伝子であることが判明した。

【0078】

(3) モチーフ検索

本発明のDNAに関して、PROSITE databaseを検索するための蛋白質解析プログラムであるpftools (Bairoch A, Bucher P, Hofmann K, Nucleic Acids Res. 1997 Jan 1;25(1):217-21)、及びPfam databaseを検索するための蛋白質解析プログラムhmmer 2.1 (Sonnhammer, E. L. L., Eddy, S. R., Birney, E., Bateman, A., and Durbin, R., Nucleic Acids Res 1998; 26, 320-322)を用いてモチーフ検索を行なった(Suyama et. al. 1999 Nucleic Acids Res. 27: 338-339)。

【0079】

詳しくは、HMMSmart検索法 (Schultz, J. et. al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA, 95: 5857-5864)によると、配列番号: 1に示されるアミノ酸配列のうちN-末端側から3-352番目にSemaphorin/CD100 antigenドメインが見出された。次に、HMMSmart検索法によると、あるいはHMMPfam検索法によっても同じく配列番号: 1に示されるアミノ酸配列のうちN-末端側から371-424番目にPlexin/Semaphorin/integrinドメインが見出された。更に、HMMPfam検索法によると、524-576番目及び671-712番目にPlexin/Semaphorin/integrinドメインを検出することができた。また、HMMSmart検索法によるとN-末端側から713-802番目に、HMMPfam検索法によるとN-末端側から714-802番目にCell surface receptor IPT/TIGドメインを、また、HMMSmart検索法によるとN-末端側から803-889番目に、HMMPfam検索法によるとN-末端側から804-889番目にCell surface receptor IPT/TIGドメインを、更に、HMMSmart検索法によるとN-末端側から891-970番目に、HMMPfam検索法によるとN-末端側から892-978番目にCell surface receptor IPT/TIGドメインが見出された。更に、SOSUIという汎用transmembrane(TM) segment検索用プログラムにより検索すると、N-末端側から1,090-1,112番目にETAIVSVIVICSVLLLLSVVALFで示される膜貫通(TM)セグメントが見出された。

。

【0080】

Semaphorin/CD100 antigenドメインは、Plexinファミリーの細胞膜外に認められるその配列の保存性が高い特徴的なドメインで、Semaphorinとの特異的結合に関係すると考えられている (文献9,16)。Plexin/Semaphorin/integrinドメインは、Plexin, Semaphorin及びIntegrinにみられる特徴的な配列からなる特定のドメインをいう。細胞外に出ているいくつかの受容体に認められるシステインに富むこの繰り返し構造の機能について詳細は不明であるが、同種親和性を經由する細胞接着を仲介する新規な神経細胞表面分子として知られている。Plexinは脳や上皮の組織中に存在しSemaphorinが誘導する脳成長錐体(growth cone)の崩壊や喪失に、また、Integrinは上皮細胞の移動機能を完結するのに関わっている (文献9,16)。IPT/TIGドメインはイムノグロブリン様の折りたたみ構造を有し、同ドメインはDNA結合に関連する細胞内転写因子と同じくMet、Ronといった細胞膜表面受容体にも認められる。Ron チロシンキナーゼ受容体はMetやSeaといったサブファミリーのメンバーと特徴的な機能を共有する。例えば、その機能は細胞の分離や解離、細胞の運動、細胞外骨格の細胞内陥没(invasion)といった現象を制御する機能である (文献9,16)。

。

【0081】

これらにより、本発明のmpf00920遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列は、1,746アミノ酸長とヒトKIAA0620と比較し237アミノ酸短く、Semaphorin/CD100 antigenドメイン、3つのPlexin/Semaphorin/integrinドメイン、及び3つのCell surface receptor IPT/TIGを有し、かつC-末端側に膜貫通(TM)セグメントが存在する、ヒトKIAA0620蛋白質(1,985アミノ酸)より239アミノ酸長短い構成 (図1)であることを見出し、機能を

推定することが可能となった。

【0082】

(4-1) マウス胎仔を用いた発生過程におけるmpf00920遺伝子の発現部位検索
ヒトKIAA0620遺伝子は、Plexinファミリー(Tamagnone, L., et al., 2001, Cell, 99:71-80)であること、ヒトKIAA0620遺伝子をプローブとしてマウス発生過程においてmRNAを検索した結果、血管内皮細胞あるいは中枢神経系(CNS)でヒトKIAA0620遺伝子とハイブリダイズするmRNAが発現していること等の報告があるが(van der Zwaag, B. et al., Dev. Dyn., 2002, 225:336-343)、本発明の新規Plexin遺伝子のマウス発生過程における、発現部位は不明であった。本発明の遺伝子うちの一つであるマウスmpf00920遺伝子の発生過程における発現部位を検索することを目的として以下の実験を行った。

【0083】

マウスmpf00920遺伝子をPCR法で増幅してProbeを作成するために必要なフォアワードプライマーとリバースプライマーを市販のDNA自動合成機を用いて合成した。フォアワードプライマーの配列を5' - CCCCAGAACTTGAACGTGTC-3' (配列番号: 3)、リバースプライマーの配列を5' - CCACCTGTTCAAACCTGTGCTG-3' (配列番号: 4)とし、それらのプライマーを用いてマウスmpf00920遺伝子の転写産物をPCR法で増幅すると、アンチセンスあるいはセンスプローブとして働く各々約1,069塩基長(bp)のDNA断片が得られる設計にした。目的とするPCR産物、すなわちアンチセンスあるいはセンスプローブ用の約1,069(bp) DNA断片をPromega社が供給するT-vectorにクローン化した。T-vectorにクローン化した1,069(bp) DNA断片を鋳型とし、T7またはSP6RNAポリメラーゼを用いてPromega社が示す方法によりマウスmpf00920遺伝子発現産物を検出可能とするアンチセンスcRNA プローブ及び陰性コントロール用として使用するセンスcRNA プローブを作製し、同遺伝子の各個体発生段階に対応した組織特異的発現解析を目的とする以下の実験に供した。

【0084】

すなわち、受精後の経過日数に従ってホールマウントin situハイブリダイゼーション用に通常用いられるin situハイブリダイゼーション用固定法により固定されたさまざまな時期の個体発生段階を反映するマウス胎仔(d.p.c: 発生段階を交尾後の日数にて表示する)を被検体として用い、SuperBioChips Lab 社が供給するDIGラベル法により同社が示すホールマウントin situハイブリダイゼーションの方法に用いてマウス胎仔ホールマウント組織特異的発現の解析を行った(参照: 細胞工学別冊 脱アイソトープ実験プロトコル、192-223、1998)。

【0085】

マウス胎仔を用いた本遺伝子発現部位の解析結果により以下の点について新知見を見出した。すなわち、マウスmpf00920遺伝子は個体発生時の血管形成時期(Vasculogenesis)にのみ血管内皮細胞特異的に発現すること、とりわけ、個体発生時における血管前駆細胞(Flkl陽性細胞)が出現する時期(7.5 ~ 8.0 d.p.c)と一致して、血管部位のmpf00920陽性シグナル認められ、血管形成時期を通して血管特異的な発現パターンを示した。顕微鏡下におけるmpf00920遺伝子の個体発生時における発現部位の詳細な解析から、mpf00920遺伝子の発現は単に血管内皮細胞特異的発現として認められるのではなく、マウス胎仔発生過程における初期血管形成時期(10.5, 8.0, 及び9.5 d.p.c)に血管内皮細胞特異的な発現パターンを示すことが認められた(図2A, 図2B, 図2C, 図2D)。一方、個体発生後期から成体にかけての時期では、血管内皮細胞特異的な発現は認められなかった。

【0086】

尚、図2Aの上の図は陰性コントロールとして用いたセンスcRNA断片で非特異的遺伝子発現の検出を、図2Aの下図はアンチセンスcRNA断片で検出したmpf00920遺伝子の発現パターンの検出を試みた結果を示す。これらの結果により、アンチセンスcRNA断片でmpf00920遺伝子発現が検出されるが、センスcRNA断片で検出されず、用いた約1,069塩基長(bp)のDNA断片が非特異的遺伝子発現のシグナルをひろう可能性が低いことが示された。

【0087】

(4-2) 受精後14.5日目胎仔及び成体におけるmpf00920遺伝子のin situハイブリダイゼーション法によるmRNAレベルでの発現頻度の検索

ヒトにおけるmRNAレベルでのヒトKIAA0620遺伝子の発現頻度についての知見はないが (<http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA0620/>、DNA Res., 1998, 5:169-176、earch, 1997, 4:345-349)、ヒトKIAA0620遺伝子と相同性を示すマウスmpf00920遺伝子のマウスにおけるmRNAレベルでの発現頻度について、in situ ハイブリダイゼーション法により成長後の成体マウスを用いて組織特異的な発現を解析することにより検索した。マウスmpf00920遺伝子をPCR法で増幅してProbeを作成するために必要なフォアワードプライマーとリバースプライマーを市販のDNA自動合成機を用いて合成した。フォアワードプライマーの配列を5' - CCCCAGAACTTGAACGTGTC-3' (配列番号: 3)、リバースプライマーの配列を5' - C CACCTGTTCAAACCTTGTGCTG-3' (配列番号: 4) とし、それらのプライマーを用いてマウスmpf00920遺伝子の転写産物をPCR法で増幅すると、アンチセンスあるいはセンスプローブとして働く各々約1,069塩基長(bp)のDNA断片が得られる設計にした。目的とするPCR産物、すなわちアンチセンスあるいはセンスプローブ用の約1,069(bp) DNA断片をPromega社が供給するT-vectorにクローン化した。T-vectorにクローン化した1,069(bp) DNA断片を鋳型とし、T7またはSP6RNAポリメラーゼを用いてPromega社が示す方法によりマウスmpf00920遺伝子発現産物を検出可能とするアンチセンスcRNA プローブ及び陰性コントロール用として使用するセンスcRNA プローブを作製し、同遺伝子の組織特異的な発現解析を目的とする以下の実験に供した。

【0088】

すなわち、マウス受精後14.5日目胎仔の矢状方向(sagittal)凍結切片を被検体として用い、Proteinase K で37℃、15 分間処理を含む固定を行った後、SuperBioChips Lab 社が供給するDIGラベル法により同社が示すin situハイブリダイゼーションの方法に従って、一つのスライドガラス上の組織片に対し500ng DIGラベルRNAをプローブとして使用し、50℃で16時間のハイブリダイゼーションを行い、組織特異的な発現解析を行った(参照:細胞工学別冊 脱アイソトープ実践プロトコル、192-223、1998)。

【0089】

表1に示したように、得られた各組織切片におけるマウスmpf00920遺伝子の発現シグナルの強度解析結果によると、発現強度は脳・大脳皮質、顎下腺に於いて強い発現が、三叉神経の神経節、骨・肋骨、広背筋、胃、腸に於いてやや強い発現が、また、皮膚・真皮、脳・小脳、骨・背骨、心臓・心房の血管、心臓・心室の心筋層、心臓・心室の血管といった各種臓器に於いて発現が認められた。皮膚の表皮、肺の血管、肺・肺胞細胞、心臓・心房の心筋層についてはシグナルが弱くて確認できなかった。図3A及び図3B参照。

【0090】

以上の結果から、本発明の遺伝子がコードするポリペプチドは、マウス受精後14.5日目胎仔において脳・大脳皮質、顎下腺に於いて強い発現が、三叉神経の神経節、骨・肋骨、広背筋、胃、腸に於いてやや強い発現が認められ、脳・神経、顎下腺、皮膚、骨、筋肉、心臓をはじめ各種臓器に広範に認められ、これにより関連する臓器、組織の発生・分化や機能保全に関わっているといえる。

【0091】

表1) マウス受精後14.5日目胎仔の矢状方向(sagittal)凍結切片を用いたin situハイブリダイゼーションの結果 (+++ : 強い発現、++ : やや強い発現、+ : 発現が認められる、- : シグナルが弱くて確認できない)

【0092】

【表1】

器官/組織・大分類	器官/組織・小分類	ハイブリダイゼーション強度
Skin(皮膚)	Epidermis(表皮)	-
	Dermis(真皮)	+
Brain(脳)	Cerebral cortex(大脳皮質)	+++
	Cerebellum(小脳)	+
Trigeminal ganglion(三叉神経の神経節)		++
Submandibular gland(顎下腺)		+++
Bone(骨)	Spine(背骨)	+
	Costea(肋骨)	++
Lung(肺)	Blood vessel(血管)	-
	Alveolar cells(肺胞細胞)	-
Heart(心臓)	Atrium(心房)-myocardium(心筋層)	-
	Atrium(心房)- blood vessel(血管)	+
	Ventricle(心室)- myocardium(心筋層)	+
	Ventricle(心室)- blood vessel(血管)	+
Latissimus dorsi muscle(広背筋)		++
Stomach(胃)		++
Intestine(腸)		++

【0093】

更に、マウス成体の各組織について作製されたパラフィン組織切片を載せたTissue Array Slide (SuperBioChips Lab社製: フナコシ株式会社が供給するLot:ZE1)を被検体として用い、Proteinase K で37℃、15 分間処理を含む固定を行った後、SuperBioChips Lab 社が供給するDIGラベル法により同社が示すin situハイブリダイゼーションの方法に従って、一つのスライドガラス上の組織片に対し500ng DIGラベルRNAをプローブとして使用し、50℃で16時間のハイブリダイゼーションを行い、組織特異的な発現解析を行った(参照:細胞工学別冊 脱アイソトープ実践プロトコル、192-223、1998)。

【0094】

表2に示したように、得られた各組織切片におけるマウスmpf00920遺伝子の発現シグナルの強度解析結果によると、同遺伝子の成長後の成体において発現強度は胃の重層扁平上皮に於いて強い発現、子宮の子宮腺上皮細胞、脳のプルキンエ細胞層に於いてやや強い発現が、また、皮膚、脾臓、心臓、舌、腎臓、精巣、大脳の神経膠細胞といった各種臓器に於いて発現が認められた。皮膚の真皮、脾臓の赤脾髄、骨格筋、肺、肺の血管、心臓の血管、唾液腺、肝臓、脾臓、小腸、大腸、卵巣、胸腺、についてはシグナルが弱くて確認できなかった。図4A、図4B、図4C参照。

【0095】

以上の結果から、本発明の遺伝子がコードするポリペプチドは、成体において胃、子宮、脳をはじめ各種臓器に広範に認められ、これにより関連する臓器、組織の発生・分化や機能保全に関わっているといえる。特に、本発明のポリペプチドが、脳・神経系における神経細胞の伸張やネットワーク維持、心臓・血管や腎臓等管腔構造を有する臓器での構造維持に関わると推定される。また、本発明のポリペプチドが、発生初期において血管新生に関わっている場合の機能と、成体における脳をはじめとする各種組織での例えば神経細

胞のガイダンスに関わっている機能とで、分子の働きが異なる可能性もある。例えば、神経細胞においてPlexinはNeuropilinと共同して、ダイマー化したSemaphorinと結合して複合体を形成し、神経細胞の伸張を追い払う調節がなされるという(文献16)。

【0096】

表2) マウス成体パラフィン組織切片を用いたin situハイブリダイゼーションの結果
(+++：強い発現、++：やや強い発現、+：発現が認められる、-：シグナルが弱くて確認できない)

【0097】

【表 2】

器官/組織・大分類	器官/組織・小分類	ハイブリダイゼーション強度
Skin(皮膚)	Epidermis(表皮)	+
Ear lobe(耳たぶ)	Dermis(真皮)	-
Spleen(脾臓)	White pulp(白脾髄)	+
	Red pulp(赤脾髄)	-
Skeletal muscle(骨格筋), Abdominal wall(腹壁)		-
Lung(肺)	Blood vessel(血管)	-
	Alveolar cells(肺胞細胞)	-
Heart(心臓)	Myocardium(心筋層)	+
	Blood vessel(血管)	-
Tongue(舌)	Muscle layer(筋層)	+
	Filiform papillae(糸状乳頭)	+
	Stratified squamous epithelium(重層扁平上皮)	+
Salivary gland(唾液腺)		+
Liver(肝臓)		-
Pancreas(膵臓)		-
Stomach(胃)	Stratified squamous epithelium(重層扁平上皮)	+++
	fundic gland(胃底腺)	+
Small intestine(小腸)		-
Colon(結腸、大腸)		-
Kidney, cortex(腎皮質)	Proximal tubule(尿細管)	+
	Tubule(遠位尿細管)	+
Kidney, medulla(腎髄質)	Tubule(管)	+
Urinary bladder(膀胱)		+
Seminal vesicle(精囊)		+
Testis(精巣)	Sertoli's cells(セルトリ細胞)	+
	Spermatocytes(精母細胞)	+
Epididymis(精巣上体)		-
Uterus(子宮)	Glandular epithelium(子宮腺上皮細胞)	++
Ovary(卵巣)		-
Thymus(胸腺)		-
Cerebrum(大脳)	neuroglia cells(神経膠細胞)	+
Pons(橋)		+
Cerebellum(小脳)	Granular layer(顆粒層)	+
	Purkinje cell layer(プルキンエ細胞層)	++

【0098】

(4-3) マウス胎仔発生過程に於けるmKIAA0620のmRNAレベルでの発現頻度
RT-PCR法によりマウスにおけるマウス胎仔発生過程に於けるmKIAA0620のmRNAレベルで

の発生段階特異的発現を解析した。フォアワードプライマーの配列を5' - CCCCAGAACTTGAACGTGTC-3' (配列番号: 3)、リバースプライマーの配列を5' -CCACCTGTTCAAACCTTGCTG-3' (配列番号: 4)とし、それらのプライマーを用いてマウスmpf00920遺伝子の転写産物をPCR法で増幅すると、アンチセンスあるいはセンスプローブとして働く各々約1,069塩基長(bp)のDNA断片が得られる設計にした。目的とするPCR産物、すなわちアンチセンスあるいはセンスプローブ用の約1,069(bp) DNA断片をPromega社が供給するT-vectorにクローン化した。T-vectorにクローン化した1,069(bp) DNA断片を鋳型とし、T7またはSP6RNAポリメラーゼを用いてPromega社が示す方法によりマウスmpf00920遺伝子発現産物を検出可能とするアンチセンスcRNA プローブ及び陰性コントロール用として使用するセンスcRNA プローブを作製し、同遺伝子のマウス胎仔発生過程に対応した発現強度解析を目的とする以下の実験に供した。すなわち、各マウス胎仔発生過程における1stストランドcDNAと上記プライマーをそれぞれ混合し、各々についてPCRを行い、マウスKIAA0620遺伝子の転写産物のうち約1,069(bp)DNA断片の増幅を図った。PCRは、TaqポリメラーゼとしてTaKaRa Ex Taq (宝酒造, #RP001A) を用い、上述のDNA混合液を95° C (2.5分) で加熱した後、95° C (30秒) /60° C (30秒) /72° C (30秒) のサイクルを35回繰り返して行った。コントロールとしてFlk1遺伝子発現を検出するプライマーを使用したFlk1転写産物由来約1129bpDNA断片の増幅も同様にして行った。増幅を終えたPCR産物を、サイズマーカーとともに2% agarose gel (Rockland社製、#50070)を用いて電気泳動で分画し、分画したPCR産物の量を半定量的に比較した(図5)。その結果、Flk1はマウス胎仔発生過程に於ける血管形成が開始された7.5d.p.c.で発現が認められ、血管形成時期を通じて9.5 d.p.c.に至るまで高発現が継続したのに対し、マウスKIAA0620遺伝子発現は、血管形成が観察されるようになる時期より少し早い6.5 d.p.c.で検出され、血管形成時期を通じて9.5 d.p.c.に至るまで高発現が継続した。このことにより、従来から血管形成のマーカー遺伝子としていわれてきたFlk1に対し、更に早い時期にKIAA0620は発現し血管形成を誘導していると推察することが出来た。

【0099】

(5-1) 5'端DNA配列伸張

マウスmKIAA0620(遺伝子名: mpf00920)の5'端はヒトKIAA0620に比較して短く、mKIAA0620塩基配列に対し付加する配列があるのではないかと推測された。しかし、上記(2)においてヒトKIAA0620遺伝子との比較から推測された5'端配列をマウスcDNAライブラリーから取得することは困難を極めた。そこで、長鎖cDNAといった対象テキスト配列が長い材料を哺乳動物のゲノム配列を高速検索することを可能にするために、特開2003-216615号公報に基づくメモリに比較回路を付加した content addressable memory (CAM)を用いた配列の長さによる計算時間が依存しない並列比較可能な計算機(ハードウェア)開発とその制御アルゴリズム設計を鋭意研究することにより、超並列ゲノムコンパレータといった改良された新規システムを構築して、長鎖cDNAを対象とした解析方法を完成した。完成した超並列ゲノムコンパレータを使用し、公開済みのマウスゲノム配列からマウスmKIAA0620に対する大規模・高速塩基配列検索を実施し、公開済みのマウスゲノム配列のなかからmKIAA0620塩基配列に対し付加する配列に関わる情報(配列番号17)を検索し、その結果、以下に具体的に示すように、本発明の配列番号1に示したアミノ酸配列のN末側に付加される251アミノ酸長のアミノ酸配列を取得するために必要なプライマー配列を設計可能にするに至った。

【0100】

(5-2) 5'端DNA配列伸張

配列2に示すmpf00920遺伝子配列の部分配列情報を基にReverse primer (AATCTTGATGTG GTACTCATGGCTCTC, 27塩基長, 名称GSP1, 配列2の3,090番目から3,116番目の27塩基長配列に対する相補的配列: 配列番号5)のデザインを行い、マウス胎仔(胎生10.5日齢)から分離・精製したTotal RNAを材料にThermoScript RNaseH- RT (Invitrogen) によるインビトロ逆転写反応(50° C 60分間)を行い、1st strand cDNA (未確認配列を含む)を合成した。次に上記コンパレータによる予想配列情報(ゲノム配列より予想)からForward

primer (AAGCTGCTGGGGCGGGAGATGGGCT, 26塩基長, 配列17の72番目から97番目の26塩基長配列: 配列番号6) を、又、配列2に示すmpf00920遺伝子配列の部分配列情報を基にしてとGSP1より少し内側にReverse primer (AATGTTGTGTCCTTTGACCCTTAC, 24塩基長, 名称GSP2, 配列2の1,524番目から1,547番目の24塩基長配列に対する相補的配列: 配列番号7) をデザインし、PCR反応を用いて、予測配列断片の増幅を行った。しかし、この領域のPCRは、通常の反応条件では増幅反応が起こらず、PCR産物を得ることができなかった。増幅が期待される領域内に反応を阻害する特殊な配列 (GCに富む配列) が存在することが推察された。そこで、GCに富む配列を含む特殊なDNA断片の増幅を可能とすることを目的とし、上記Forward primerとReverse primer (GSP2) を使用して、Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen: Cat No. 11708-013) と添付のPCR Enhancer solutionを用い、条件 (1×PCR x Enhancer solution 条件: Denature: 94℃ for 15s Anneal: 50℃ for 30s Extend: 68℃ for 3min 30s, 40cycles) を新たに設定して伸張反応を行った。その結果、目的とする断片約2,300塩基長 (753+1,547) を含む約2,314塩基長のDNA断片をPCR反応により増幅することが出来た。

【0101】

得られたDNA断片をプライマリーな鋳型として、上記同様Platinum Pfx DNA Polymeraseを用いてNested PCRを行った。すなわち、Forward primer (TTGTCGAC ACAAGTTTGTACAAAA AAGCAGGCTCT atg ggc tgt ggg cgt ggt ctc cac gga gcc gcc ccc ggg ctg agc, 80塩基長, 配列17の91番目から135番目の45塩基長配列を含む80塩基長: 配列番号8) を、又、配列2に示すmpf00920遺伝子配列の部分配列情報を基にしてとGSP2より少し内側にReverse primer (AAATGTGGCTGGCTGGAGTTGGT, 23塩基長, 配列2の1,215番目から1,237番目の23塩基長配列に対する相補的配列: 配列番号9) をデザインし、GCに富む配列を含む特殊なDNA断片の増幅を可能とすることを目的とした上記で述べた PCR 条件を参考としてNested PCRを行った。PCR反応条件の詳細は、final: 1× PCR Enhancer solution, Denature: 94℃ for 15s Anneal: 50℃ for 30s Extend: 68℃ for 3min, 35cyclesであった。その結果、目的とする断片約2,020塩基長 (35+748+1,237) を含むDNA断片をPCR反応により増幅することが出来た。

【0102】

得られたPCR産物をpCR4Blunt TOP0 vector (Invitrogen: Cat.No. K4575-J10) へ挿入し、大腸菌 (DH5α株) の形質転換を行い、目的とするPCR産物を含むプラスミドDNAを取得した。取得した形質転換株を用いて得られたプラスミドDNAの増幅を行い、増幅したプラスミドDNAを用いてシーケンサーによる目的とするPCR産物の塩基配列の決定を行った。その結果、753塩基長の新規な塩基配列 (配列番号10) 及びそれにコードされるアミノ酸配列 (配列番号11) を新規配列として取得することが出来た。配列番号10を用いた解析結果から、配列番号11がコードする2番目のMetがN' 端であると推定された。これはヒトKIAA0620遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列で推定されるN' 末端のMetの位置、あるいはvan der Zwaag等 (Dev. Dyn., 2002, 225:336-343, : 非特許文献8) の報告にあるヒトPLEXIN-D1のアミノ酸配列のN' 末端のMetの位置に比較して71アミノ酸長だけ長い。そこで、本発明の発現実験に於いては、配列番号11の2番目のMetを含むDNA断片を使用した。しかし、同van der Zwaag等の報告にあるヒトPLEXIN-D1のアミノ酸配列で示されるN' から30番目から46番目のシグナル配列 (cleavable signal sequence) に相当する配列が、配列11の102番目から120番目に認められることから、機能的には配列番号11のマウス配列に於いても73番目のMetから蛋白合成が始まっているもおかしくはない。すなわち配列11の2番目と73番目のMetは共に蛋白合成開始点である可能性が考えられた。

【0103】

(5-3) ホモロジー検索

こうして得られた、mpf00920塩基配列に対し5'に付加した251アミノ酸長及び753塩基長の配列についてホモロジー検索を、FASTA等により検索を実施した結果、比較的高いホモ

ロジーを示す配列が2件認められたが、実質的に同一である配列はない。

【0104】

即ち、国際公開番号W0200114420-A2 (発明の名称: Human Plexin-D1, Applicant: Hys eq INC., Publication date: 11, Oct. 2001) のHuman Plexin-D1 (1,925アミノ酸長)の1番目から177番目の177アミノ酸長のアミノ酸配列と、本発明の mpf00920アミノ酸配列に対し5'に付加した251アミノ酸長の配列(配列15で示すアミノ酸配列における1番目から251番目のアミノ酸配列)の73番目から251番目の179アミノ酸長のアミノ酸配列とで、やや高いホモロジーが認められる(約86.03%)。

【0105】

更に、国際公開番号W0200157188-A2 (発明の名称: Human plexin-B1/SEP receptor homologue, SEQ ID NO:2079, Applicant: Hyseq INC., Publication date: 09, Aug. 2001) のHuman Plexin-B1/SEP receptor homologue, SEQ ID NO:2079D1 (1,992アミノ酸長)の1番目から237番目の237アミノ酸長のアミノ酸配列と、本発明の mpf00920アミノ酸配列に対し5'に付加した251アミノ酸長の配列(配列15で示すアミノ酸配列における1番目から251番目のアミノ酸配列)の13番目から251番目の237アミノ酸長のアミノ酸配列とで、やや高いホモロジーが認められた(約80.75%)。

【0106】

以下に示すように、mpf00920塩基配列に対し5'に付加した753塩基長の配列(配列16で示す塩基配列における1番目から753番目の塩基配列)とホモロジーを有する部分配列をクレームする出願は下記のように2件あるが本発明で追加した753塩基長実質的に同一である配列の出願はない。

【0107】

国際公開番号W0200281745-A2 (発明の名称: Coding sequence SEQ ID 118, downregulated in osteogenesis, Applicant: Aventis Pharma SA., Publication date: 17, Oct. 2002) のCoding sequence SEQ ID 118, downregulated in osteogenesis(6,754塩基長)の284番目から709番目までの426塩基長あるいは25番目から230番目までの206塩基長と、本発明の5'に付加した753塩基長の配列(配列16で示す塩基配列における1番目から753番目の塩基配列)のうち328番目から753番目までの426塩基長あるいは64番目から268番目までの205塩基長とで、約89.28%あるいは95.15%という比較的高いホモロジーが認められた。

【0108】

国際公開番号W0200157188-A2 (発明の名称: Human plexin-B1/SEP receptor-encoding cDNA, SEQ ID NO:729, Applicant: HYSEQ INC., Publication date: 09, Aug., 2001)のHuman Plexin-B1/SEP receptor homologue-encoding cDNA, SEQ ID NO:729(7,080塩基長)の配列番号284番目から709番目までの426塩基長あるいは配列番号25番目から230番目までの206塩基長と、本発明の5'に付加した753塩基長の塩基配列(配列16で示す塩基配列における1番目から753番目の塩基配列)のうち配列番号328番目から753番目までの426塩基長あるいは配列番号64番目から268番目までの205塩基長とで、約89.28%あるいは95.15%という比較的高いホモロジーが認められた。

【0109】

以上のホモロジー検索の結果から、既に記載したmpf00920遺伝子(配列2で示す塩基配列)の5'に753塩基長の塩基配列が付加された塩基配列(配列16で示す塩基配列)は、各々ヒトKIAA0620遺伝子と比較的高いホモロジーを示し、既にいくつかの報告がある数個の既知遺伝子に類似であるが、全く新しい齧歯類由来の新規遺伝子であることが判明した。

【0110】

(6) 遺伝子導入細胞作製

配列2で示すmpf00921遺伝子配列(5'端配列を欠く非全長cDNA: 6,178塩基長)と上記(5)で取得した5'端DNA断片(配列番号10)を含むPCR産物を用いて以下の手順で、ORF該当部位の全長cDNA(配列16)を取得した。最初に配列2で示すmpf00921遺伝子配列(マウスKIAA0620の非全長cDNA)をpBluescript SK(+)のマルチクローニングサイトに挿

入して組換えプラスミドを作製した。すなわち、pBluescript SK(+)のマルチクローニングサイトの配列内Bam HIサイトを利用し、同一制限酵素で切断処理した5'端DNA断片をフレームが合うようにデザインしLigationし、大腸菌 (DH5 α 株) の形質転換を行い、目的とする完全長DNA断片を含むプラスミドDNAを取得した。完全長ORFcDNA (5,992塩基長: 1,996アミノ酸長のポリペプチドに終始コドンが付加した配列を含めた長さ)を含む上記プラスミドを大腸菌へ形質転換後、精製・回収した。このプラスミドを鋳型に複数の発現コンストラクトを作製した。発現コンストラクト作製には、Gatewayクローニングテクノロジー (Invitrogen: Cat.No. 11821-014) システムを利用し、以下の目的PCR産物をpENTR/D-TOP0 Vector (Invitrogen:)へ組み込んだエントリークローンを作製した。ネイティブ蛋白質用として用いるPCR産物は、完全長cDNA(開始コドンから終始コドンまで)として次のプライマーを設計し合成して使用しPCR反応により作製した。すなわち、Forward primerとして CACCatgggctgtggcggtgtct (24塩基長、配列16の6番目から25番目の20塩基長配列を含む24塩基長配列: 配列番号12)を、Reverse primerはReverse primer1 (TCAGGCCTCGCTGTAACACTCATAGA, 26塩基長、配列2の5,218番目から5,243番目の26塩基長配列に対する相補的配列、終始コドンを含む: 配列番号13)を用いてエントリークローンを作製した。また、タグ付き融合蛋白型用として用いるタグ付きPCR産物は、タグ付き完全長cDNA(開始コドンから終始コドンまで)として次のプライマーを設計し合成して使用しPCR反応により作製した。すなわち、Reverse primerは上述のForward primer (CACCatgggctgtggcggtgtct, 24塩基長、配列16の6番目から25番目の20塩基長配列を含む24塩基長配列: 配列番号12)をReverse primerはReverse primer2 (GGCCTCGCTGTAACACTCATAGA, 23塩基長、配列2の5,218番目から5,240番目の23塩基長配列に対する相補的配列、終始コドンを含まない: 配列番号14)を用いてエントリークローンを作製した。

【0111】

各エントリークローンをLR Clonase酵素ミックス (Invitrogen: Cat.No.11791-019)を用いた部位特異的組換え反応により発現用デステイネーションベクター (pcDNA-DEST40 vector, pcDNA-DEST47 vector: どちらもCAGプロモーター制御下にて発現するプラスミドベクター)へ組換えて発現ベクターの構築を行い、マウスKIAA0620ネイティブ蛋白質、マウスKIAA0620-GFP-HisTag、マウスKIAA0620-V5融合蛋白質型の哺乳類細胞での強制発現ベクターを構築した。これらをTransfection 試薬 (Fugene6; Roche社またはTransIT-LT1試薬; Mirus社)を用いてヒト胎児由来腎細胞 (HEK293T細胞)に遺伝子導入し、遺伝子導入細胞を作製した。

【0112】

(7-1) 合成ペプチドを抗原としたウサギポリクローナル抗体の作製

マウスKIAA0620遺伝子がコードするポリペプチドの一部からなるアミノ酸配列をもとに、ペプチド合成して作製した合成ペプチドを免疫原 (抗原)として、常法に従い、ウサギポリクローナル抗体を作製した。抗原としてはmpf00920ポリペプチド配列のうちC-末端から約169アミノ酸離れたところにある15アミノ酸長配列 (配列: FLEEQAERGISDPD)に対し末端にシステインを付加した合成ペプチド (配列: CFLEEQAERGISDPD)を、そのN-末で担体とするキーホールリンベットヘモシアニン (KLH)にキャリアーカップリングさせ、担体と結合した合成ペプチドを80%から90%の純度までに精製したものを抗原として用いた。日本白色種家兎 (メス)に初回は抗原量0.15mgにて皮内免疫を、その後は約2週間ごとに抗原量0.3mgにて4回の感作を実施して合計5回の皮内免疫を行った。3回目、4回目の各皮内免疫の後の約5週間目、約7週間目に各々5mlの試験採血を行い、HRPO (ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ)結合ヤギIgG抗ウサギ抗体 (CAPPEL社製)を用いたELISA法にて抗原に対する抗体値を測定した。全部で2回の試験採血において、夫々、1,000倍希釈、2,000倍希釈、4,000倍希釈、8,000倍希釈、16,000倍希釈にて吸光度 (490nm)が3となり、試験採血において抗体価の十分な上昇を確認された。この2回目の試験採血の後、約8週目に5回の感作を実施し、その後、約9週間目に抗体精製用の全採血を行った。採血した血液から血清を遠心にて分離し抗血清を得た。その抗血清を、ウサギポリクローナル抗体 (anti-mKIAA0620 ab)として用いた。

【0113】

また、コントロール血清を確保する目的で免疫前に試採血（3 ml）を前もって実施した。免疫前のコントロール血清において、1,000倍希釈、2,000倍希釈、4,000倍希釈、8,000倍希釈、16,000倍希釈にて吸光度（490nm）が各々0.171、0.101、0.089、0.084、0.076となり、抗原として用いたアミノ酸配列は免疫前ウサギ血清と反応せず特異性があることが確認された。

【0114】

（7-2）精製ウサギポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法による各種遺伝子導入細胞でのマウスKIAA0620蛋白質の検出

上記で得られた精製ウサギポリクローナル抗体を用い、ウエスタンブロット法にて各種遺伝子導入細胞でのマウスKIAA0620蛋白質の検出を試みた。遺伝子導入細胞からの蛋白質回収操作については、マウスKIAA0620遺伝子強制発現ベクター導入HEK293T細胞を培養ディッシュ上でPBS(-)溶液で洗浄し、Lysis Buffer(TNE buffer)を用いピペッティング操作を繰り返して可溶化させ、可溶化した溶液を28Gの注射針を通し、次に、遠心操作(700g, 10min)後、上清をサンプル液として回収した。サンプル液にはマウスKIAA0620遺伝子導入細胞由来蛋白質が含まれる。その他のサンプルとして、マウスKIAA0620蛋白質のV5融合蛋白質型を発現する発現ベクターを導入したHEK293T細胞を使用し、上記と同様な方法でサンプル液を調製した。各種サンプル液をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)にて分画した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、ポリアクリルアミドゲルの各レーンに約20マイクログラムの各種遺伝子導入細胞由来蛋白質をアプライして電気泳動で分画し、次に分画した蛋白質をメンブレンにプロットし、プロットしたメンブレンに対し500または1000倍希釈した抗体を用いて免疫染色反応を行った。すなわち、ポリアクリルアミドゲル電気泳動はInvitrogen社製の4~12%Tris-Glycine Gel(#No. EC6035Box)を用いて行い、Bio Rad社製のセミドライ式トランスファーセルを用いて蛋白質を転写し、メンブレンにプロットした。二次抗体には5000倍希釈したBiosource社製Goat Anti-Rabbit IgG, HRP-conjugate 抗体(#No. ALI0404)を用い、検出には同社のECL Western blotting Detection Reagents(#No. RPN2133)を用いた。分子量を知る目的でナカライテスク社製のプレスティンDタンパク質マーカー(High Range, SDS-PAGE(#No. 26039-75)を各サンプルとともに電気泳動した。

【0115】

まず、マウスKIAA0620蛋白質のV5融合蛋白質型を発現する発現ベクターを導入したHEK293T組換え細胞あるいはその他の組換え細胞を出発材料としたメンブレンにおいて、抗V5-HRP抗体(5000倍希釈で使用)を用いたウエスタンブロッティング法による検出実験においては、抗V5-HRP抗体によりマウスKIAA0620-V5融合蛋白質のサイズ(約220 kDa)に一致する位置に明瞭な単一バンドを検出することが出来た。検出したバンドの分子量が、マウスKIAA0620-V5融合蛋白質の理論上の分子量と一致することから、マウス完全長KIAA0620蛋白質がV5融合蛋白質として発現していることが確認出来た。

【0116】

次に、マウスKIAA0620蛋白質のV5融合蛋白質型を発現する発現ベクターを導入したHEK293T組換え細胞あるいはコントロールとして使用した組換え細胞を出発材料としたメンブレンにおいて、上記で得られた精製ウサギポリクローナル抗体(抗mKIAA0620抗体)を500倍、1,000倍希釈して用いた検出系においては、マウスKIAA0620-V5融合蛋白質のサイズ(約220 kDa)に一致する位置に明瞭なバンドが検出された。一方、約220 kDa以外にも数本のバンドがより低分子量の位置に検出された。それらの数本のバンドがマウスKIAA0620-V5融合蛋白質に起因するかどうかはこの実験からは明らかでない。マウスKIAA0620は膜貫通部分を含むのでサンプル調製の過程において、十分に可溶化されずに膜画分に残り可溶性画分には含量が少なく認められた分子量の低い数本のバンドに比較して見かけ上少ない含量として検出された可能性もある。これにより、作製したポリクローナル抗体が目的とするmKIAA0620蛋白質融合蛋白と反応し、本発明のポリクローナル抗体(抗mKIAA0620抗体)がmKIAA0620蛋白質アミノ酸配列を検出するのに有用と判断された。尚、以上の結果は

図6に示す。

【0117】

(8) in situ ハイブリダイゼーション法を用いた新生仔網膜血管に於けるマウスKIAA0620遺伝子発現の時間的・空間的同定

マウス胎仔網膜血管における於けるmKIAA0620遺伝子のmRNAレベルでの時間的・空間的発現を解析した。フォワードプライマーの配列を5' - CCCCAGAACTTGAACGTGTC-3' (配列番号: 3)、リバープライマーの配列を5' -CCACCTGTTCAAACCTTGTGCTG-3' (配列番号: 4)とし、それらのプライマーを用いてマウスmpf00920遺伝子の転写産物をPCR法で増幅すると、アンチセンスあるいはセンスプローブとして働く各々約1,069塩基長(bp)のDNA断片が得られる設計にした。目的とするPCR産物、すなわちアンチセンスあるいはセンスプローブ用の約1,069(bp) DNA断片をPromega社が供給するT-vectorにクローン化した。T-vectorにクローン化した1,069(bp) DNA断片を鋳型とし、RNA 合成酵素 (Roche社、DIG RNA Labeling Kit)を用いてRoche社が示す方法によりマウスmpf00920遺伝子発現産物を検出可能とするアンチセンスcRNA プローブ及び陰性コントロール用として使用するセンスcRNA プローブを作製し、新生仔ICRマウスより摘出した網膜におけるマウスKIAA0620 遺伝子の発現を網膜フラットマウントin situ ハイブリダイゼーション法により観察した。また、抗マウス4型コラーゲン抗体 (LSL社、ウサギポリクローナル抗体)を用いた免疫染色法を同一サンプルにて行い、網膜血管網の観察を同時に行ない血管に沿ってマウスKIAA0620 遺伝子発現が認められることを確認した。これらの実験結果から、新生仔マウス (生後2ないし4日) 網膜における発達途上の血管では、特に新生血管先端部位の内皮細胞においてマウスKIAA0620遺伝子発現が非常に強く認められた。これに対し、生後7日マウス網膜では、マウスKIAA0620遺伝子発現は網膜周辺部における血管新生部位に認められるのみで、すでに血管が形成されている網膜中心部では、当該遺伝子の発現が著しく消退していることが認められた (図7)。

【0118】

(9) 本発明遺伝子の機能推定

本発明のポリペプチド配列についてモチーフ検索を行った結果、Semaphorin/CD100 antigenドメイン、3つのPlexin/Semaphorin/integrinドメイン、及び3つのCell surface receptor IPT/TIGを有し、かつC-末端側に膜貫通(TM)セグメントが存在する構成である、全く新しいタイプの齧歯類由来新規Plexinポリペプチドといえる。

【0119】

PlexinファミリーにはPlexin-A (タイプA1、タイプA2、タイプA3、及びタイプA4)、Plexin-B (タイプB1、タイプB2、及びタイプB3)、Plexin-C1、Plexin-D1と4つのサブファミリーに分類されること、PlexinAはセマフォリン1aの機能的な受容体として、PlexinB1は膜貫通セマフォリンSema4D(CD40)の受容体として、Plexin-C1はGPIがアンカーしたセマフォリンSema7A(Sema-K1)の受容体として働くことが報告されている (Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming G, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodman CS, Poo M, Tessier-Lavigne M, Comoglio PM., 2001, Cell, 99:71-80)。更に、Plexinファミリーに属するPlexin蛋白質は、分子量が大きな膜貫通型の蛋白質であり、膜外の特徴的なシステインに富むドメインを含有する。その受容体としては、セマフォリンあるいはニューロフィリンが知られている。セマフォリンは、神経系において神経軸索ガイダンスの反発として影響を与えること、また、血管や筋肉の発達、免疫反応、血管新生、腫瘍の成長や転移に影響を与えることが報告されている。特に、Plexin-Aは運動神経あるいはCNS (Central Nervous System)の神経軸索ガイダンスを調節することが知られている。

【0120】

本発明のポリペプチドはヒトPlexin-D1に比較的高いホモロジーを有し、Plexinファミリーに共通して認められる膜外に位置するsemaドメイン、システインに富むMRSモチーフ、及びSPドメインといわれるplexinに特徴的な膜内ドメインが全て認められる。特にシステインに富むMRSモチーフのコンセンサス配列はC-X(5-6)-C-X(2)-C-X(6-8)-C-X(2)-C-X(3-5)-Cで、本発明の配列には1つの完全なMRSモチーフともう1つの不完全なMRSモチーフ

が認められた。これらの特徴的構造を有するPlexin蛋白質は、軸索ガイダンスに重要な役割を持ち、形態形成(morphogenesis)や病気に起因する現象(癌の侵襲や転移)に関係するので重要である(Tamagnone, L. et al., 2001, Cell, 99:71-80)。従って、本発明のポリペプチドも血管新生等に必要なガイダンスに重要な役割を持ち、脈管形成(vasculogenesis)、及びそれから一連の血管構築過程を経ることにより完成する血管新生(angiogenesis)や病気に起因する現象(癌の侵襲や転移)と深く関わるので動物の個体維持にとって重要である。例えば、脳・神経系においてはNeuropilinと共同してSemaphorinと結合することによって、あるいは血管形成においてはNeuropilinと共同してVEGFと結合することによって文献16, 17)、本発明の新規Plexinポリペプチドが神経や血管内皮の増殖・分化を新規なシグナル伝達系を介して調節する可能性が容易に考えられる。

【0121】

また、mpf00920遺伝子の成体に於ける組織特異的発現パターンから、本発明のポリペプチドは個体発生過程の血管形成を担う役割のみならず各種組織における細胞の重要な機能に係わっていると類推される。これらを総合すると、本発明の新規Plexinポリペプチドは、主に発生初期には血管発生、分化過程に関与するが、その他にも成体においては管空構造を有する組織、細胞つまり胃腺、子宮腺、尿細管と言った細胞の重要なプロセスを担う新規ポリペプチドであり、それら重要機能に関わる各種臓器における生体内の複合蛋白質の中心をなしているといえる。

【0122】

更に、mpf00920遺伝子由来の該遺伝子発現検出用プローブは、齧歯類等における個体発生時の血管内皮細胞(Flk-1陽性細胞：文献1, 10, 12, 14)を特異的に染色するので、血管新生(angiogenesis)におけるごく初期の時期(内皮細胞の増殖・分化の時期)から、出現する血管内皮細胞(Flk-1陽性細胞)を検出可能である。血管新生における次の段階(内皮細胞の形態形成及び動脈、静脈への分化の時期)では、構成する内皮細胞がFlt-1陽性(Flt-1陽性細胞：文献1, 10)となるがこの時期にも本発明の遺伝子は発現している。また、本発明の遺伝子がコードするポリペプチドは細胞膜受容体構造を持つため、そのリガンドは新規血管誘導因子である可能性が予測され、該ポリペプチドあるいはそれに対応する抗体は、予測される血管誘導因子を探索するためのツールとして利用可能である。

【0123】

これまでに、ヒトKIAA0620遺伝子に関連する齧歯類に由来するラット、マウスあるいはハムスター等、とりわけマウス由来Plexin様ポリペプチドをコードする新規DNAの取得がなされた例がない。また、新規Plexinアミノ酸配列をコードする本発明の遺伝子配列は、mRNAレベルでの発現頻度解析の結果、個体発生時の血管形成時期の初期から血管形成時期全般を通して血管特異的に発現し、成長後の成体では胃・重層扁平上皮に於いて強い発現、子宮に於いてやや強い発現が、また脳をはじめとした各種臓器に於いて発現していることが今回初めて見出され、本発明の遺伝子がコードする蛋白質が、血管形成時期の初期から血管形成時期全般を通して血管特異的に、また成体では多くの組織に於いて細胞の増殖・分化を制御する重要な働きに関わっている可能性が示された。

【0124】

本発明の新規ポリペプチドをコードする遺伝子は、特に血管形成時期の初期から血管形成時期全般を通して血管特異的発現と、成長後の成体に於いては各種臓器で発現していることを特徴とし、本発明のポリペプチドは新規なポリペプチドであり、それら組織に於いて発育、機能保全、あるいは全身の臓器に関わる病態(例えば癌化・老化・機能不全)解明、それによる予防薬、治療薬、検査薬の開発に有用であることが明らかで、それが本発明の優れた点である。また、本発明の組換え蛋白質、あるいは組換え蛋白質を発現する組換え体を利用することにより、アゴニスト、アンタゴニストのスクリーニングあるいはドラッグデザイン研究に利用できる点が優れている。

【0125】

更に、mpf00920遺伝子は、齧歯類等における個体発生時の血管内皮細胞(Flk-1陽性細胞：文献1, 2, 3, 10, 12, 14)あるいは血管内皮細胞の前駆細胞から血管内皮細胞に分化する途

中の細胞の新規な分子マーカーとして有用であること、また、該遺伝子がコードするポリペプチドは細胞膜受容体構造を持つため、そのリガンドは新規血管誘導因子である可能性が予測され、該ポリペプチドあるいはそれに対応する抗体は、予測される血管誘導因子を探索するためのツールとして有用である。

【0126】

ヒトKIAA0620遺伝子のヒトにおけるmRNAレベルの発現について知見はないが、同遺伝子とハイブリダイズするmRNAがマウス発生過程での血管内皮細胞あるいは中枢神経系(CNS)でmRNAが発現していることが報告されたが(van der Zwaag, B. et al., Dev. Dyn., 2002, 225:336-343)、本発明のmpf00920遺伝子は、個体発生時の血管形成時期の初期から血管形成時期全般を通して血管特異的に発現し、成長後の成体では胃・重層扁平上皮に於いて強い発現、子宮に於いてやや強い発現が、また脳をはじめとした各種臓器に於いて発現していることから、特に血管新生において、また、脳をはじめとする各種臓器において、発育、機能保全、あるいは各種臓器における血管新生が関係する病態や老化、機能不全、あるいは先天奇形など分化異常を含めたヒト疾患の機序解明及び診断・治療薬、検査薬の開発に有用である。本発明の組換え蛋白質、あるいは組換え蛋白質を発現する組換え体を利用することにより、アゴニスト、アンタゴニストのスクリーニングあるいはドラッグデザイン研究に利用できる。

【0127】

このように血管内皮の増殖・分化や老化に極めて重要なヒトKIAA0620遺伝子に関連する齧歯類に由来するラット、マウスあるいはハムスター等、とりわけマウス由来Plexin様ポリペプチドをコードする遺伝子は、それ自身も直接疾患原因遺伝子となりうる。本発明のPlexin様ポリペプチドについては、以下の疾患原因となりうるものが容易に推察される。

【0128】

例えば、各種臓器における血管新生が関係する病態(例えば傷治癒、骨折治癒、血管閉塞と側副血行路形成等、また、血管新生過程が関与しそれが望ましくない癌増殖、慢性関節リウマチ、糖尿病性網膜症、子宮内膜症、肥満、また、血管新生過程が望ましい心臓発作、神経変性疾患、足の血行障害、閉塞性動脈硬化症、尋常性乾癬等の疾患原因となりうる。

【0129】

本発明の本発明のマウスmKIAA0620ポリペプチドのアミノ酸配列、それをコードする核酸配列、該アミノ酸配列に特異的に結合する抗体を応用することにより有用性を発揮できる医療分野は、血管新生と病態との関わりがある次のような分野である。すなわち、成長後に於いて正常な血管新生過程に関わる傷治癒、骨折治癒、血管閉塞と側副血行路形成、子宮粘膜での周期的血管網形成(一過性、黄体形成時)等に於ける血管増殖・分化調節因子あるいは薬剤の、また、血管新生過程が関与しそれが望ましくない癌増殖、慢性関節リウマチ、糖尿病性網膜症、子宮内膜症、肥満、また、血管新生過程が望ましい心臓発作、神経変性疾患、足の血行障害、閉塞性動脈硬化症、尋常性乾癬といった各種病気に於ける、血管増殖・分化調節因子あるいは薬剤の研究開発に係る分野である(文献1, 4, 5, 7, 11)。特に、癌増殖については癌組織での新生血管形成に関与していることが想定されるので、本発明により製造可能となるツールを使用することにより、エンドスタチン、アンジオスタチン(文献6, 7)に代表される生体内でつくられる固形癌増殖を停止せしめる能力がある各種増殖阻害因子、あるいは受容体フックローカー、細胞外結合部位に対するモノクローナル抗体等、特異的な血管新生を阻害する増殖阻害因子、薬物が見出されれば抗癌剤として使用が可能となる。また、再生治療において血管芽細胞の単離用蛋白あるいは抗体、また単離した血管芽細胞増殖(文献1, 2, 3, 14)に関連する増殖因子、増殖阻害因子の新規スクリーニング系に使用可能である。

【0130】

ヒトKIAA0620蛋白質、あるいはPlexinファミリーD1にホモロジーを有する、本発明のマウスmKIAA0620ポリペプチドのアミノ酸配列、それをコードする核酸配列、該アミノ酸配列に特異的に結合する抗体を使用することにより、目的とするマウス等齧歯類遺伝子ある

いは遺伝子産物等を利用した、血管増殖分化制御因子、あるいは制御合成化合物のスクリーニング方法、及び測定キット、言い替えると組換え蛋白質を用いて相互作用検出系作製、アゴニスト・アンタゴニスト・生体内リガンド検索系作製を、また遺伝子導入細胞、動物遺伝子導入動物を作製することによってin vitro またはin vivo病態モデルを作製し、該遺伝子の発現を制御する化合物を組換え細胞、組換え動物で評価したりすることが可能となり、血管細胞増殖分化制御、癌増殖を支持する血管増殖阻害に関わる研究が遺伝子を変異させた病態モデル動物を作製することが可能となる。また、作製した組換え細胞、マウス等病態モデル動物変異動物を利用することにより、アゴニスト、アンタゴニストのスクリーニングあるいはドラッグデザイン研究に利用点が優れている。さらに、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列、それをコードする核酸配列、該アミノ酸配列に特異的に結合する抗体を使用することによりの血管細胞増殖分化制御、癌増殖を支持する血管増殖阻害機構の解明、それによる予防薬、治療薬、検査薬の開発に有用であることが明らかで、それが本発明の優れた点である

【産業上の利用可能性】

【0131】

これまでに記載したことから、本発明のDNA、本発明のポリペプチドあるいは本発明の抗体は、血管新生において、あるいは脳をはじめとする各種臓器において、発育、機能保全、あるいは各種臓器における血管新生が関係する疾患や老化、機能不全、あるいは先天奇形など分化異常を含めたヒト疾患の機序解明及び診断・治療上、また、各種臓器の機能保全や老化の防止に必要な役割を果たすと考えられる。また、mRNAレベルでの発現頻度解析のよる各組織及び発生段階での発現のパターン情報は、各種臓器に普遍的に発現していること、及び各発生過程に於いて普遍的に発現していることを明らかとし、本発明の遺伝子が各種臓器の発生・分化やその機能保全また老化において重要性であること明らかにした。

【0132】

従って、本発明のDNA及び該DNAを含む齧歯類由来遺伝子、それらがコードするポリペプチドの一部又は全長、該ポリペプチドの一部又は全長に対する抗体、アンチセンスDNA等は、癌や先天奇形を含めたヒト疾患を治療する為のモデル動物であるマウスを用いた各種治療・予防方法開発において、医薬や検査薬として使用することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0133】

【図1】本発明の新規Plexinポリペプチドに認められたSemaphorin/CD100 antigenドメイン、3つのPlexin/Semaphorin/integrinドメイン、3つのCell surface receptor IPT/TIGドメイン、及び膜貫通(TM)セグメントを示す (aa: アミノ酸配列で数字はアミノ酸数、ボックス: 上から、HMMPfam検索法、HMMSmart検索法、またSosui検索法といった異なった検索法にて同定したドメインと膜貫通(TM)セグメントを示す。これらの結果から、HMMPfam検索法、HMMSmart検索法、またSosui検索法により、新規Plexinポリペプチドを新たに同定した。

【図2A】ホールマウントin situ 法によるmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子のマウス各発生段階10.5 d.p.c.における発現部位を示す。センスプローブによる陰性コントロールによる検出像を示す(血管にそった濃染部位が発現部位)。

【図2B】ホールマウントin situ 法によるmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子のマウス各発生段階10.5 d.p.c.における発現部位を示す。アンチセンスプローブによるmpf00920遺伝子の発現強度を示す(血管にそった濃染部位が発現部位)。

【図2C】ホールマウントin situ 法によるmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子のマウス各発生段階8 d.p.c.における発現部位を示す(血管にそった濃染部位が発現部位)。

【図2D】ホールマウントin situ 法によるmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子のマウス各発生段階9.5 d.p.c.における発現部位を示す(血管にそって濃染部位が認められる)。

【図 3 A】受精後14.5日目胎仔の矢状方向(sagittal)凍結切片について、in situ 法によるmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子の発現部位を示す。上はセンスプローブによる陰性コントロールによる検出像を示し、下はアンチセンスプローブによるmpf00920遺伝子の発現強度を示す(濃染部位が発現部位)。

【図 3 B】アンチセンスプローブによるmpf00920遺伝子の発現強度の脳の強拡大した検出像を示す(濃染部位が発現部位)。

【図 4 A】成体における胃のパラフィン切片について、in situ 法によるmRNAレベルでのmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子の発現部位を示す。胃の重層扁平上皮濃染部位が濃染されている。

【図 4 B】成体における脳のパラフィン切片について、in situ 法によるmRNAレベルでのmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子の発現部位を示す。脳の神経膠細胞が濃染されている。

【図 4 C】成体における小脳のパラフィン切片について、in situ 法によるmRNAレベルでのmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子の発現部位を示す。小脳のプルキンエ細胞層が濃染されている。

【図 5】RT-PCR法によるマウスKIAA0620遺伝子のマウス胎仔発生過程に於けるmRNAレベルでの発現頻度の比較を示す電気泳動の写真である。上段はコントロールとして用いたFlkl遺伝子の発現強度、下段はマウスKIAA0620遺伝子の発現強度を、アガロース電気泳動で分画した後のエチジウムブロミド染色パターンについて示す。

【図 6】ウサギポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法によるHEK293細胞を宿主とするlacZ-V5融合蛋白質(lacZ-V5 proteins)及びマウスKIAA0620-V5融合蛋白質(mKIAA0620-cds-V5 proteins)の検出の結果を示すメンブレンフィルターの写真である。図中、M: high range marker、1: HEK293 total proteins、2: lacZ-V5 proteins、3: mKIAA0620-cds-V5 proteins (以上の1～4レーンは抗V5-HRP抗体による染色)、4: HEK293 total proteins、5: lacZ-V5 proteins、6: mKIAA0620-cds-V5 proteins、7: HEK293 total proteins、8: lacZ-V5 proteins、9: mKIAA0620-cds-V5 proteins、(以上の5～8レーンは抗mKIAA0620抗体による染色)を夫々示す。尚、図中の数値は希釈倍率を示す。

【図 7】in situ ハイブリダイゼーション法を用いた新生仔網膜血管におけるマウスKIAA0620遺伝子発現の検出の結果を示す顕微鏡の写真である(図左: 生後2日目、中央: 4日目、右: 7日目; 血管新生にそって濃染部位が認められる)。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE FOUNDATION; Japan Science and Technology Agency; Institute for Biomedical Research and Innovation

<120> Novel Plexin Polypeptide, DNA Encoding thereof and Their Use

<130> AB04039

<150> JP 2003-371040

<151> 2003-10-30

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1746

<212> PRT

<213> mouse

<400> 1

Ser	Met	Leu	Asn	Val	Ala	Ala	Asn	His	Pro	Asn	Ala	Ser	Thr	Val	Gly
1				5					10					15	

Leu	Val	Leu	Pro	Pro	Thr	Ser	Gly	Thr	Gly	Gly	Ser	Arg	Leu	Leu	Val
			20					25					30		

Gly	Ala	Thr	Tyr	Thr	Gly	Phe	Gly	Ser	Ala	Phe	Phe	Pro	Arg	Asn	Arg
		35					40					45			

Ser	Leu	Glu	Asp	His	Arg	Phe	Glu	Asn	Thr	Pro	Glu	Ile	Ala	Ile	Arg
	50					55					60				

Ser	Leu	Asp	Ala	Arg	Gly	Asp	Leu	Ala	Lys	Leu	Phe	Thr	Phe	Asp	Leu
65					70				75					80	

Asn	Pro	Ser	Asp	Asp	Asn	Ile	Leu	Lys	Ile	Lys	Gln	Gly	Ala	Lys	Glu
				85					90					95	

Gln	His	Lys	Leu	Gly	Phe	Val	Arg	Ala	Phe	Leu	His	Pro	Ala	Val	Pro
			100					105					110		

Pro His Ser Ala Gln Pro Tyr Ala Tyr Leu Ala Leu Asn Ser Glu Ala
115 120 125

Arg Ala Gly Asp Lys Asp Ser Gln Ala Arg Ser Leu Leu Ala Arg Ile
130 135 140

Cys Leu Pro Arg Gly Ala Gly Gly Asp Ala Lys Lys Leu Thr Glu Ser
145 150 155 160

Tyr Ile Gln Leu Gly Leu Gln Cys Ala Gly Gly Ala Gly Arg Gly Asp
165 170 175

Leu Tyr Ser Arg Leu Val Ser Val Phe Pro Ala Arg Glu Gln Phe Phe
180 185 190

Ala Val Phe Glu Arg Pro Gln Gly Ala Pro Gly Ala Arg Asn Ala Pro
195 200 205

Ala Ala Leu Cys Ala Phe Arg Phe Asp Asp Val Gln Ala Ala Ile Arg
210 215 220

Ala Ala Arg Thr Ala Cys Phe Val Glu Pro Ala Pro Asp Val Val Ala
225 230 235 240

Val Leu Asp Ser Val Val Gln Gly Thr Gly Pro Ala Cys Glu Ser Lys
245 250 255

Arg Asn Ile Gln Leu Gln Pro Glu Gln Leu Asp Cys Gly Ala Ala His
260 265 270

Leu Gln His Pro Leu Thr Ile Leu Gln Pro Leu Arg Ala Ser Pro Val
275 280 285

Phe Arg Ala Pro Gly Leu Thr Ala Val Ala Val Ala Ser Ala Asn Asn
290 295 300

Tyr Thr Ala Val Phe Leu Gly Thr Ala Thr Gly Arg Leu Leu Lys Ile
305 310 315 320

Ser Leu Asn Glu Ser Met Gln Val Val Ser Arg Arg Val Leu Thr Val
325 330 335

Ala Tyr Gly Glu Pro Val His His Val Met Gln Phe Asp Pro Met Asp
340 345 350

Pro Gly Tyr Leu Tyr Leu Met Thr Ser His Gln Met Ala Arg Val Lys
355 360 365

Val Ala Ala Cys Glu Val His Ser Thr Cys Gly Asp Cys Val Gly Ala
370 375 380

Ala Asp Ala Tyr Cys Gly Trp Cys Thr Leu Glu Thr Arg Cys Thr Leu
385 390 395 400

Gln Gln Asp Cys Thr Asn Ser Ser Gln Pro His Phe Trp Thr Ser Ala
405 410 415

Ser Glu Gly Pro Ser Arg Cys Pro Ala Met Thr Val Leu Pro Ser Glu
420 425 430

Ile Asp Val His Arg Asp Tyr Thr Gly Met Ile Leu Gln Ile Ser Gly
435 440 445

Ser Leu Pro Ser Leu Ser Gly Met Glu Met Ala Cys Asp Tyr Gly Asn
450 455 460

Gly Val Arg Thr Val Ala Arg Val Pro Gly Pro Ala Tyr Asp His Gln
465 470 475 480

Ile Ala Tyr Cys Asn Leu Leu Pro Arg Ala Gln Phe Pro Ser Phe Pro
485 490 495

Ala Gly Gln Asp His Val Thr Val Glu Met Ser Val Arg Val Lys Gly
500 505 510

His Asn Ile Val Ser Ala Asn Phe Thr Ile Tyr Asp Cys Ser Arg Ile
515 520 525

Gly Gln Val Tyr Pro His Thr Ala Cys Thr Ser Cys Leu Ser Thr Gln
530 535 540

Trp Pro Cys Ser Trp Cys Ile Gln Leu His Ser Cys Val Ser Asn Gln
545 550 555 560

Ser Gln Cys Gln Asp Ser Pro Asn Pro Thr Ser Pro Gln Asp Cys Pro
565 570 575

Gln Ile Leu Pro Ser Pro Leu Ala Pro Val Pro Thr Gly Gly Ser Gln
580 585 590

Asp Ile Leu Val Pro Leu Thr Lys Ala Thr Phe Phe His Gly Ser Ser
595 600 605

Leu Glu Cys Ser Phe Gly Leu Glu Glu Ser Phe Glu Ala Val Trp Ala
610 615 620

Asn Asn Ser Leu Val Arg Cys Asn Gln Val Val Leu His Thr Thr Gln
625 630 635 640

Lys Ser Gln Val Phe Pro Leu Ser Leu Lys Leu Lys Gly Pro Pro Asp
645 650 655

Arg Phe Leu Asp Ser Pro Asn Pro Met Thr Val Val Val Tyr Asn Cys
660 665 670

Ala Met Gly Ser Pro Asp Cys Ser Gln Cys Leu Gly Arg Glu Asp Leu
675 680 685

Gly His Leu Cys Val Trp Asn Asp Gly Cys Arg Leu Arg Gly Pro Leu
690 695 700

Gln Pro Leu Pro Gly Thr Cys Pro Ala Pro Glu Ile Arg Ala Ile Glu
705 710 715 720

Pro Leu Ser Gly Pro Leu Asp Gly Gly Thr Leu Leu Thr Ile Arg Gly
725 730 735

Arg Asn Leu Gly Arg Arg Leu Ser Asp Val Ala His Gly Val Trp Ile
740 745 750

Gly Ser Val Ala Cys Glu Pro Leu Ala Asp Arg Tyr Thr Val Ser Glu
755 760 765

Glu Ile Val Cys Ala Thr Gly Pro Ala Ala Gly Ala Phe Ser Asp Val
770 775 780

Val Thr Val Asn Val Ser Lys Glu Gly Arg Ser Arg Glu Gln Phe Ser
785 790 795 800

Tyr Val Leu Pro Thr Val His Ser Leu Glu Pro Ser Met Gly Pro Lys
805 810 815

Ala Gly Gly Thr Arg Ile Thr Ile His Gly Ser Asp Leu Asn Val Gly
820 825 830

Ser Met Leu Gln Val Leu Val Asn Asp Thr Asp Pro Cys Thr Asp Leu
835 840 845

Thr Arg Thr Ala Thr Ser Ile Thr Cys Thr Val Pro Gly Gly Thr Leu
850 855 860

Pro Ser Pro Val Pro Val Cys Val Arg Phe Glu Ser Arg Gly Cys Val
865 870 875 880

His Gly Asn Leu Thr Phe Trp Tyr Met Gln Asn Pro Val Ile Thr Ala
885 890 895

Ile Ser Pro Gly Arg Ser Pro Val Ser Gly Gly Arg Thr Ile Thr Val
900 905 910

Ala Gly Glu Arg Phe His Met Val Gln Asn Val Ser Met Ala Val His
915 920 925

His Ile Gly Arg Glu Pro Thr Phe Cys Lys Val Leu Asn Ser Thr Leu
930 935 940

Ile Thr Cys Pro Ser Pro Gly Ala Leu Ser Asn Ala Ser Ala Pro Val
945 950 955 960

Asp Phe Phe Ile Asn Gly Arg Ala Tyr Ala Asp Glu Ala Ala Glu Glu
965 970 975

Leu Leu Asp Pro Ala Glu Ala Gln Arg Gly Ser Arg Phe Arg Leu Asp
980 985 990

Tyr Leu Pro Asn Pro Gln Phe Ser Thr Ala Lys Arg Glu Lys Trp Ile
995 1000 1005

Lys His His Pro Gly Glu Pro Leu Thr Leu Val Ile His Lys Glu
1010 1015 1020

Gln Asp Ser Leu Gly Leu Glu Ser His Glu Tyr His Ile Lys Ile
1025 1030 1035

Gly Gln Val Ser Cys Asp Ile Gln Ile Ile Ser Asp Arg Val Ile
1040 1045 1050

His Cys Ser Val Asn Glu Ser Leu Gly Thr Ala Glu Gly Gln Leu
1055 1060 1065

Pro Ile Thr Ile Gln Val Gly Asn Phe Asn Gln Thr Ile Ala Thr
1070 1075 1080

Leu Gln Leu Gly Gly Ser Glu Thr Ala Ile Val Val Ser Ile Val
1085 1090 1095

Ile Cys Ser Val Leu Leu Leu Leu Ser Val Val Ala Leu Phe Val
1100 1105 1110

Phe Cys Thr Lys Ser Arg Arg Ala Glu Arg Tyr Trp Gln Lys Thr
1115 1120 1125

Leu Leu Gln Met Glu Glu Met Glu Ser Gln Ile Arg Glu Glu Ile
1130 1135 1140

Arg Lys Gly Phe Ala Glu Leu Gln Thr Asp Met Thr Asp Leu Thr
1145 1150 1155

Lys Glu Leu Asn Arg Ser Gln Gly Ile Pro Phe Leu Glu Tyr Lys
1160 1165 1170

His Phe Val Thr Arg Thr Phe Phe Pro Lys Cys Ser Ser Leu Tyr
1175 1180 1185

Glu Glu Arg Tyr Val Leu Pro Ser Lys Thr Leu Asn Ser Gln Gly
1190 1195 1200

Gly Ser Pro Pro Gln Glu Thr His Pro Leu Leu Gly Glu Trp Asn
1205 1210 1215

Ile Pro Glu His Cys Arg Pro Ser Met Glu Glu Gly Ile Ser Leu
1220 1225 1230

Phe Ser Ser Leu Leu Asn Asn Lys His Phe Leu Ile Val Phe Val
1235 1240 1245

His Ala Leu Glu Gln Gln Lys Asp Phe Ala Val Arg Asp Arg Cys
1250 1255 1260

Ser Leu Ala Ser Leu Leu Thr Ile Ala Leu His Gly Lys Leu Glu
1265 1270 1275

Tyr Tyr Thr Ser Ile Met Lys Glu Leu Leu Val Asp Leu Ile Asp
1280 1285 1290

Ala Ser Ala Ala Lys Asn Pro Lys Leu Met Leu Arg Arg Thr Glu
1295 1300 1305

Ser Val Val Glu Lys Met Leu Thr Asn Trp Met Ser Ile Cys Met
1310 1315 1320

Tyr Gly Cys Leu Arg Glu Thr Val Gly Glu Pro Phe Phe Leu Leu
1325 1330 1335

Leu Cys Ala Ile Lys Gln Gln Ile Asn Lys Gly Ser Ile Asp Ala
1340 1345 1350

Ile Thr Gly Lys Ala Arg Tyr Thr Leu Asn Glu Glu Trp Leu Leu
1355 1360 1365

Arg Glu Asn Ile Glu Ala Lys Pro Arg Asn Leu Asn Val Ser Phe
1370 1375 1380

Gln Gly Cys Gly Met Asp Ser Leu Ser Val Arg Ala Met Asp Thr
1385 1390 1395

Asp Thr Leu Thr Gln Val Lys Glu Lys Ile Leu Glu Ala Phe Cys
1400 1405 1410

Lys Asn Val Pro Tyr Ser Gln Trp Pro Arg Ala Glu Asp Val Asp
1415 1420 1425

Leu Glu Trp Phe Ala Ser Ser Thr Gln Ser Tyr Val Leu Arg Asp
1430 1435 1440

Leu Asp Asp Thr Ser Val Val Glu Asp Gly Arg Lys Lys Leu Asn
1445 1450 1455

Thr Leu Ala His Tyr Lys Ile Pro Glu Gly Ala Ser Leu Ala Met
1460 1465 1470

Ser Leu Thr Asp Lys Lys Asp Ser Thr Leu Gly Arg Val Lys Asp
1475 1480 1485

Leu Asp Thr Glu Lys Tyr Phe His Leu Val Leu Pro Thr Asp Glu
1490 1495 1500

Leu Val Glu Pro Lys Lys Ser His Arg Gln Ser His Arg Lys Lys
1505 1510 1515

Val Leu Pro Glu Ile Tyr Leu Thr Arg Leu Leu Ser Thr Lys Gly
1520 1525 1530

Thr Leu Gln Lys Phe Leu Asp Asp Leu Phe Lys Ala Ile Leu Ser
1535 1540 1545

Ile Arg Glu Asp Lys Pro Pro Leu Ala Val Lys Tyr Phe Phe Asp
1550 1555 1560

Phe Leu Glu Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gly Ile Ser Asp Pro Asp
1565 1570 1575

Thr Leu His Ile Trp Lys Thr Asn Ser Leu Pro Leu Arg Phe Trp
1580 1585 1590

Val Asn Ile Leu Lys Asn Pro Gln Phe Val Phe Asp Ile Glu Lys
1595 1600 1605

Thr Asp His Ile Asp Ala Cys Leu Ser Val Ile Ala Gln Ala Phe
1610 1615 1620

Ile Asp Ala Cys Ser Ile Ser Asp Leu Gln Leu Gly Lys Asp Ser
1625 1630 1635

Pro Thr Asn Lys Leu Leu Tyr Ala Lys Glu Ile Pro Glu Tyr Arg
1640 1645 1650

Lys Thr Val Gln Arg Tyr Tyr Lys Gln Ile Gln Asp Met Thr Pro
1655 1660 1665

Leu Ser Glu Gln Glu Met Asn Ala His Leu Ala Glu Glu Ser Arg
1670 1675 1680

Lys Tyr Gln Asn Glu Phe Asn Thr Asn Val Ala Met Ala Glu Ile
1685 1690 1695

Tyr Lys Tyr Ala Lys Arg Tyr Arg Pro Gln Ile Met Ala Ala Leu
1700 1705 1710

Glu Ala Asn Pro Thr Ala Arg Arg Thr Gln Leu Gln His Lys Phe
1715 1720 1725

Glu Gln Val Val Ala Leu Met Glu Asn Asn Ile Tyr Glu Cys Tyr
1730 1735 1740

Ser Glu Ala
1745

<210> 2
<211> 6178
<212> DNA
<213> mouse

<400> 2
ccagcatgct caacgtggcc gccaccacc ccaacgcgtc cactgtggga ctggtgctgc 60
cgcctacctc gggcaccggg ggcagccgtc tgctcgtggg cgccacgtac accggcttcg 120
gcagcgcttt cttcccgcgc aaccgtagcc tagaagacca ccgcttcgag aacacgcccg 180
agatcgciat ccgctccctg gacgcgcgtg gagacttggc caagctcttc accttcgacc 240
ttaaccctgc ggacgataac atcctgaaga tcaagcaggg cgccaaggag cagcacaagc 300
tgggccttcgt gcgtgccttc ttgcaccgg cggtgccacc gcacagcgcg cagccctacg 360
cgctacctggc gctcaacagc gaggcgcgtg cgggcgacaa ggacagccag gcgcgcagcc 420
tgctggcgcg catctgcctg ccccgcgggc cgggtggcga cgccaagaag ctcaccgagt 480
cctacatcca actgggcttg cagtgcgcgg gcggcgcggg ccgcggcgac ctctacagcc 540

gcctcgtgtc ggttttcccc gcgcgcgagc agttcttcgc cgtcttcgag cggccccagg 600
gcgccccagg tgcccgaac gccccggccg cgctttgcgc cttccgcttc gacgacgtgc 660
aggctgccat tcgtgcagcg cgcaccgcct gcttcgtgga gccggcgccc gacgtggtgg 720
cgggtgttga cagtgtggtg cagggcaccg ggccggcctg cgagagcaag cgcaacatac 780
agctgcagcc ggagcaactg gattgcggag cggcccacct gcagcaccca ctgaccatcc 840
tgcagccgct gagggcatcg cccgtgttcc gtgctccagg gctcacggcc gtggctgtgg 900
ccagtgccaa caactacacg gccgtcttcc tgggcaccgc cacagggagg ctctcaaga 960
tcagcctgaa cgagagcatg caggtagtaa gcaggcgagt gctgactgta gcctatgggg 1020
agcctgtgca tcacgtcatg cagtttgacc ccatggatcc tggttaccta tacctgatga 1080
catcccacca gatggcccga gtgaagggtg cagcgtgtga ggtacactcc acctgcgggg 1140
actgcgtggg tgcggccgat gcctactgtg gttggtgcac tctggagacc cgggtgcacac 1200
tccagcagga ttgcaccaac tccagccagc cacatttctg gaccagtgcc agtgagggcc 1260
ccagccgctg ccctgccatg acagtactgc cctcggagat tgatgtgcac cgggactaca 1320
caggtatgat cttacagatc tcaggaagcc tgcccagcct cagcggcatg gagatggctt 1380
gtgactatgg aaatggcggt cgaacgggtg cccgggtacc tggccctgcc tatgatcatc 1440
agattgccta ctgcaatctc ctgcccaggg cccagtttcc atcctttcct gctggccagg 1500
accacgtgac cgttgagatg tctgtaaggg tcaaaggaca caacattgtc tcagccaatt 1560
tcaccatcta cgactgcagc cgaattggac aagtctaccc ccatacagcc tgtaccagct 1620
gcctgtccac acagtggcct tgctcctggt gcatccagct gcattcatgt gtctccaacc 1680
agtctcagtg ccaggactcg ccaaacccca cgagtcctca ggactgtccc cagatcctgc 1740
cctcgcccct agcgcccgtg cccacaggtg gctcccaaga catcctgggtg cccctgacta 1800
aagccacctt cttccatggt tcctccctcg agtgcagctt tgggctggaa gagagctttg 1860
aggctgtatg ggccaataac tcaactggcc gctgcaacca agtggtgctg cacacaacc 1920
agaagagcca ggtatttcca ctgagtctga agctgaaggg gccgccagac cgattcctag 1980
acagccctaa ccccatgaca gttgtggtct acaactgtgc tatgggcagc cctgactgtt 2040

cccagtgcct gggccgtgag gacctgggtc acctctgtgt ttggaatgat ggctgtcgtc 2100
taagagggcc cctgcagcca ctccctggca cctgcccagc ccctgaaatc cgagcgattg 2160
agcctctgag tggccccttg gacgggtggga ctttctgtac catccgtggc aggaacttgg 2220
gccgtcggct cagtgatgtg gcacatggtg tgtggattgg cagtgtggcc tgtgaacccc 2280
tggctgacag atacaccgtt tcagaggaga tcgtgtgtgc cacagggcct gccgcagggg 2340
ccttctcaga cgtggtaacg gtgaacgtct ccaaggaagg caggtctcgg gaacagttct 2400
cctatgtgct gcccacggtc cactcactgg agccttccat gggcccaaag gccgggggta 2460
caaggatcac cattcacggc agtgacctca acgtgggctc tatgctccag gtcctggtga 2520
atgacacgga cccctgcaca gatcttacgc gcacagccac cagcatcacc tgcactgtgc 2580
caggggggtac cctgccctct ccagtgcctg tgtgtgtgcg cttcgagagc cggggctgcg 2640
tgcacggaaa cctcacctc tggtagatgc agaaccagc catcacagcc atcagcccag 2700
gccgcagccc tgtcagtggc ggcaggacca tctgtgtggc tggcgaacgc ttccacatgg 2760
tgcagaatgt atcaatggct gtacaccaca ttggccggga gcccacgttc tgcaaggttc 2820
tcaactccac actcatcacc tgcccattc ctggagccct gagcaatgct tcggcgcctg 2880
tagacttctt catcaatggc cgggcatatg cagacgaggc agccgaggag ctgctggacc 2940
ctgcagaggc acagaggggc agccggttcc gcctagacta cctccccaac ccacagttct 3000
ccacagccaa gagggagaag tggatcaaac atcaccagg agagccgctc accctcgtca 3060
tccataagga gcaagacagc ctggggctgg agagccatga gtaccacatc aagattggcc 3120
aggtgtcctg cgacatccag atcatctcag acagagtcac cactgtctca gtcaatgagt 3180
cgctgggcac ggctgaagga cagctgccc tacaatcca ggtggggaac ttcaaccaga 3240
ccatcgccac actgcaactg gggggcagcg agacggccat tgtggtgtcc atcgtcatct 3300
gcagtgtcct gtgtgtgtg tctgtggtg ctctgttcgt cttctgcacc aagagccgcc 3360
gtgccgagcg ctactggcag aagaccctgc tgcagatgga agagatggag tctcagatcc 3420
gagaggagat ccgtaaaggc tttgcggagc tgcagacaga catgacggat ctaccaagg 3480
agctgaaccg cagccagggc atccccctt tggagtacaa gcacttcgtg actcgaacct 3540

tcttcccaaa gtgctcttcc ctctatgaag agcggatatgt gctgccctcg aagaccctca 3600
actcccaggg tggctccccg ccacaggaaa cccaccact gctgggagag tggaacatcc 3660
ctgaacactg tcggcccagc atggaggagg ggatcagcct gttctcctca ctgctcaaca 3720
acaagcactt cctcatcgtc ttcgtccatg ctctggagca gcagaaggac ttcgcagtgc 3780
gtgacagggtg cagcctggcg tccctgctga ccatcgcgct gcacggcaag ctggagtact 3840
atacgagcat catgaaggag ctgctcgtgg acctcatcga cgcctcggcg gccaagaacc 3900
ccaagctcat gttgcggcgc acggagtctg tgggtggagaa gatgcttacc aactggatgt 3960
ccatctgcat gtacggctgc ctgagggaga cagtaggtga gccgttcttc ctgctgttgt 4020
gtgccatcaa gcagcagatc aacaaaggct ccatcgacgc catcacaggc aaagcccgt 4080
acacactcaa cgaggagtgg ctgctgaggg agaacattga ggccaagccc cggaacttga 4140
acgtgtcctt ccagggctgt gggatggact cctcagcgt gcgggccatg gacaccgaca 4200
cgctgacgca ggtgaaggag aagatcctgg aagccttctg caagaacgtc ccctactcac 4260
agtggccgcg ggcggaggac gtggaccttg aatggtttgc ctcgagtacc cagagctacg 4320
tcctccggga cctggatgac acatcagtgg tggaggacgg ccgtaagaaa ctgaacacac 4380
tggcccacta caagatacct gagggcgcct ccctagccat gagcctcaca gacaagaagg 4440
acagtaccct gggcagagtg aaagacttgg acacagaaaa gtatttccat ttggtgctac 4500
ctacggatga gctggtagag cctaagaaat ctaccggca gagccaccgc aagaaagtat 4560
tgccagagat ctacctgacc cgcctgctgt ccaccaaggg cacgctgcag aagtccctag 4620
atgacctgtt caaggctatc ctgagcatcc gagaggacaa gccccgctg gctgtcaagt 4680
atttctttga cttcctagag gaacaggcgg agaagagagg catctccgac cctgacaccc 4740
tgcatatctg gaagaccaac agccttcccc tgcgttctg ggtgaacatc ttaaaaaatc 4800
cccagtttgt cttcgacata gagaagacgg accacatcga cgcctgcctg tctgtcatcg 4860
cacaggcctt catcgatgcc tgcctcatct ctgacctgca gctgggcaag gactcaccca 4920
ccaacaagct tctgtacgcg aaggagatcc ctgagtaccg gaagaccgta cagcgctatt 4980
ataaacagat ccaagacatg acgccgctca gcgagcagga aatgaacgca cacctggccg 5040

aggagtctcg gaaataccag aatgagttca acacaaacgt ggccatggct gagatttata 5100
aatatgctaa gaggtatcga ccacagatca tggctgccct ggaggccaac cccacagccc 5160
gcaggaccca gctacagcac aagtttgaac aggtggtggc tctgatggaa aacaatatct 5220
atgagtgtta cagcgaggcc tgatgcagaa gagtgaccag gagcttcggc cagggagacg 5280
gcgtgcaggc cacttggcct ccacttggtt tcttccccac atctctcact tgggctggga 5340
actgacagag gagcctgctg ggctaggagt gggggacact ggccctcttag tgcccggctg 5400
ccgagctctt ggcccttgtcc cctggggcat ctctgtcccc tccacctgcc caagacccaa 5460
ctctaggatg aaggccttga atatcgatcg ctgccagtcc ctaataagac tttccctgcc 5520
aaccaggaca gcctggacca tgcctgcctg ttcactgttt caggctgctc agcacacatt 5580
gggagagggtg gccatatccc agaacactac ctcatccacc tggcagaggg aatttctgct 5640
tcagccacca agcagttgtc tgtgtccctc atccagaggg ggcccttggcc accaacagtt 5700
ccaaaccagg tcagctgtta gccgtctcat tggccagtgg cagcatgggc agtgcccatt 5760
gccacagaa cgggtggagag agggggacag gctggggggtt cctggcccca ggaaaggag 5820
gaaggcgagg atgcagggt gtagctggac tactcagtct tcctggaagt gtttctaaag 5880
agcaccactt ttttttgttt tttgtttttt aagaaaaaaa aaacttttat atattaaaac 5940
aaaaacttat gcaccaactg tgaatagctg ccgcttgtgc agatccccag gggctcccgg 6000
tgacacactg gaaatgactg ttccagggga cagaaaatac tcatctgtcc ccagcacagc 6060
ccccaccca cccccatag ctgctgagac tggctcacag cccaaggggg ctgggctgga 6120
ggggaaggct gggactctct ggaacattct ttataataaa agcctgccgg gaaaacct 6178

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Forward Primer

<400> 3
ccccggaact tgaacgtgtc

20

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Reverse Primer

<400> 4
ccacctgttc aaacttgtgc tg 22

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Reverse Primer (GSP1)

<400> 5
aatcttgatg tgggtactcat ggctctc 27

<210> 6
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Forward Primer

<400> 6
aagctgctgg ggcggggaga tgggct 26

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Reverse Primer (GSP2)

<400> 7
aatgttgtgt cctttgaccc ttac 24

<210> 8

<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Forward Primer

<400> 8
ttgtcgacac aagtttgtac aaaaaagcag gctctatggg ctgtgggcgt ggtctccacg 60
gagccgcccc cgggctgagc 80

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Reverse Primer

<400> 9
aaatgtggct ggctggagtt ggt 23

<210> 10
<211> 753
<212> DNA
<213> mouse

<400> 10
gagatgggct gtgggcgtgg tctccacgga gccgcccccg ggctgagcgc ctgccagag 60
tcgggccggg ggcgccgggc cggggggcggc aggcgcgggc aggaagcgcc tcgcggccccg 120
ggcccccccc ccgcctctcg ccgcctccga gctcccggct cccggccgcg ccgcgccccca 180
tgactcgcg ggcgcgcgca gcccgcgctc gcctggatgg ctgctcgcgc cgcgggcggc 240
gcacccccta ggcgccgggc cgcgcgggcc gtccccttgc gtccgcgccc tactcgcgg 300
ggccctggtc tgctgccgct gcctctgctg ctgctgctcg gggcggcacg ggccggcgcc 360
ctagagatcc agcgccgttt cccctcgccc acgcccacca acaacttcgc cctggacggc 420
acggcgggca ccgtgtactt ggccggcagt aaccgcctgt accaactgtc gaggccaac 480
ttgagcctgg aagccgaggc gaccgtgggt cccgtgccgg acagcccgt gtgtcacgcc 540
ccgcagctcc cgcaggcctc gtgcgagcac ccgcggcgcc tcacggacaa ctacaacaaa 600

atcctgcagt tggacccggg ccagggtctg gtggtcgcgt gcggctccat ctaccagggt 660
 ctgtgccagc tgaggcgccg gggcaacatc tcagccctgg ccgtgagctt tccgcctgcc 720
 gcgccgaccg cagaaccggt caccgtgttc ccc 753

<210> 11
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> mouse

<400> 11

Glu Met Gly Cys Gly Arg Gly Leu His Gly Ala Ala Pro Gly Leu Ser
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Glu Ser Gly Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Arg
 20 25 30

Gly Gln Glu Ala Pro Arg Gly Pro Gly Pro Pro Pro Ala Ser Arg Arg
 35 40 45

Leu Arg Ala Pro Gly Ser Arg Pro Arg Arg Ala Pro Cys Thr Arg Arg
 50 55 60

Ala Ala Gln Pro Ala Leu Ala Trp Met Ala Arg Arg Ala Ala Gly Gly
 65 70 75 80

Ala Pro Pro Ser Ala Arg Ala Ala Ala Val Pro Leu Arg Pro Arg
 85 90 95

Pro His Ser Arg Gly Pro Gly Leu Leu Pro Leu Pro Leu Leu Leu
 100 105 110

Leu Gly Ala Ala Arg Ala Gly Ala Leu Glu Ile Gln Arg Arg Phe Pro
 115 120 125

Ser Pro Thr Pro Thr Asn Asn Phe Ala Leu Asp Gly Thr Ala Gly Thr
 130 135 140

Val Tyr Leu Ala Ala Val Asn Arg Leu Tyr Gln Leu Ser Ser Ala Asn
145 150 155 160

Leu Ser Leu Glu Ala Glu Ala Thr Val Gly Pro Val Pro Asp Ser Pro
165 170 175

Leu Cys His Ala Pro Gln Leu Pro Gln Ala Ser Cys Glu His Pro Arg
180 185 190

Arg Leu Thr Asp Asn Tyr Asn Lys Ile Leu Gln Leu Asp Pro Gly Gln
195 200 205

Gly Leu Val Val Ala Cys Gly Ser Ile Tyr Gln Gly Leu Cys Gln Leu
210 215 220

Arg Arg Arg Gly Asn Ile Ser Ala Leu Ala Val Ser Phe Pro Pro Ala
225 230 235 240

Ala Pro Thr Ala Glu Pro Val Thr Val Phe Pro
245 250

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Forward Primer

<400> 12
caccatgggc tgtgggcgtg gtct

24

<210> 13
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Reverse Primer 1

<400> 13

tcaggcctcg ctgtaacact cataga

26

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Reverse Primer 2

<400> 14
ggcctcgctg taacactcat aga

23

<210> 15
<211> 1997
<212> PRT
<213> mouse

<400> 15

Glu Met Gly Cys Gly Arg Gly Leu His Gly Ala Ala Pro Gly Leu Ser
1 5 10 15

Ala Ser Pro Glu Ser Gly Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Arg
20 25 30

Gly Gln Glu Ala Pro Arg Gly Pro Gly Pro Pro Pro Ala Ser Arg Arg
35 40 45

Leu Arg Ala Pro Gly Ser Arg Pro Arg Arg Ala Pro Cys Thr Arg Arg
50 55 60

Ala Ala Gln Pro Ala Leu Ala Trp Met Ala Arg Arg Ala Ala Gly Gly
65 70 75 80

Ala Pro Pro Ser Ala Arg Ala Ala Ala Val Pro Leu Arg Pro Arg
85 90 95

Pro His Ser Arg Gly Pro Gly Leu Leu Pro Leu Pro Leu Leu Leu
100 105 110

Leu Gly Ala Ala Arg Ala Gly Ala Leu Glu Ile Gln Arg Arg Phe Pro
 115 120 125

Ser Pro Thr Pro Thr Asn Asn Phe Ala Leu Asp Gly Thr Ala Gly Thr
 130 135 140

Val Tyr Leu Ala Ala Val Asn Arg Leu Tyr Gln Leu Ser Ser Ala Asn
 145 150 155 160

Leu Ser Leu Glu Ala Glu Ala Thr Val Gly Pro Val Pro Asp Ser Pro
 165 170 175

Leu Cys His Ala Pro Gln Leu Pro Gln Ala Ser Cys Glu His Pro Arg
 180 185 190

Arg Leu Thr Asp Asn Tyr Asn Lys Ile Leu Gln Leu Asp Pro Gly Gln
 195 200 205

Gly Leu Val Val Ala Cys Gly Ser Ile Tyr Gln Gly Leu Cys Gln Leu
 210 215 220

Arg Arg Arg Gly Asn Ile Ser Ala Leu Ala Val Ser Phe Pro Pro Ala
 225 230 235 240

Ala Pro Thr Ala Glu Pro Val Thr Val Phe Pro Ser Met Leu Asn Val
 245 250 255

Ala Ala Asn His Pro Asn Ala Ser Thr Val Gly Leu Val Leu Pro Pro
 260 265 270

Thr Ser Gly Thr Gly Gly Ser Arg Leu Leu Val Gly Ala Thr Tyr Thr
 275 280 285

Gly Phe Gly Ser Ala Phe Phe Pro Arg Asn Arg Ser Leu Glu Asp His
 290 295 300

Arg Phe Glu Asn Thr Pro Glu Ile Ala Ile Arg Ser Leu Asp Ala Arg
 305 310 315 320

Gly Asp Leu Ala Lys Leu Phe Thr Phe Asp Leu Asn Pro Ser Asp Asp
325 330 335

Asn Ile Leu Lys Ile Lys Gln Gly Ala Lys Glu Gln His Lys Leu Gly
340 345 350

Phe Val Arg Ala Phe Leu His Pro Ala Val Pro Pro His Ser Ala Gln
355 360 365

Pro Tyr Ala Tyr Leu Ala Leu Asn Ser Glu Ala Arg Ala Gly Asp Lys
370 375 380

Asp Ser Gln Ala Arg Ser Leu Leu Ala Arg Ile Cys Leu Pro Arg Gly
385 390 395 400

Ala Gly Gly Asp Ala Lys Lys Leu Thr Glu Ser Tyr Ile Gln Leu Gly
405 410 415

Leu Gln Cys Ala Gly Gly Ala Gly Arg Gly Asp Leu Tyr Ser Arg Leu
420 425 430

Val Ser Val Phe Pro Ala Arg Glu Gln Phe Phe Ala Val Phe Glu Arg
435 440 445

Pro Gln Gly Ala Pro Gly Ala Arg Asn Ala Pro Ala Ala Leu Cys Ala
450 455 460

Phe Arg Phe Asp Asp Val Gln Ala Ala Ile Arg Ala Ala Arg Thr Ala
465 470 475 480

Cys Phe Val Glu Pro Ala Pro Asp Val Val Ala Val Leu Asp Ser Val
485 490 495

Val Gln Gly Thr Gly Pro Ala Cys Glu Ser Lys Arg Asn Ile Gln Leu
500 505 510

Gln Pro Glu Gln Leu Asp Cys Gly Ala Ala His Leu Gln His Pro Leu
515 520 525

Thr Ile Leu Gln Pro Leu Arg Ala Ser Pro Val Phe Arg Ala Pro Gly
530 535 540

Leu Thr Ala Val Ala Val Ala Ser Ala Asn Asn Tyr Thr Ala Val Phe
545 550 555 560

Leu Gly Thr Ala Thr Gly Arg Leu Leu Lys Ile Ser Leu Asn Glu Ser
565 570 575

Met Gln Val Val Ser Arg Arg Val Leu Thr Val Ala Tyr Gly Glu Pro
580 585 590

Val His His Val Met Gln Phe Asp Pro Met Asp Pro Gly Tyr Leu Tyr
595 600 605

Leu Met Thr Ser His Gln Met Ala Arg Val Lys Val Ala Ala Cys Glu
610 615 620

Val His Ser Thr Cys Gly Asp Cys Val Gly Ala Ala Asp Ala Tyr Cys
625 630 635 640

Gly Trp Cys Thr Leu Glu Thr Arg Cys Thr Leu Gln Gln Asp Cys Thr
645 650 655

Asn Ser Ser Gln Pro His Phe Trp Thr Ser Ala Ser Glu Gly Pro Ser
660 665 670

Arg Cys Pro Ala Met Thr Val Leu Pro Ser Glu Ile Asp Val His Arg
675 680 685

Asp Tyr Thr Gly Met Ile Leu Gln Ile Ser Gly Ser Leu Pro Ser Leu
690 695 700

Ser Gly Met Glu Met Ala Cys Asp Tyr Gly Asn Gly Val Arg Thr Val
705 710 715 720

Ala Arg Val Pro Gly Pro Ala Tyr Asp His Gln Ile Ala Tyr Cys Asn
725 730 735

Leu Leu Pro Arg Ala Gln Phe Pro Ser Phe Pro Ala Gly Gln Asp His
740 745 750

Val Thr Val Glu Met Ser Val Arg Val Lys Gly His Asn Ile Val Ser
755 760 765

Ala Asn Phe Thr Ile Tyr Asp Cys Ser Arg Ile Gly Gln Val Tyr Pro
770 775 780

His Thr Ala Cys Thr Ser Cys Leu Ser Thr Gln Trp Pro Cys Ser Trp
785 790 795 800

Cys Ile Gln Leu His Ser Cys Val Ser Asn Gln Ser Gln Cys Gln Asp
805 810 815

Ser Pro Asn Pro Thr Ser Pro Gln Asp Cys Pro Gln Ile Leu Pro Ser
820 825 830

Pro Leu Ala Pro Val Pro Thr Gly Gly Ser Gln Asp Ile Leu Val Pro
835 840 845

Leu Thr Lys Ala Thr Phe Phe His Gly Ser Ser Leu Glu Cys Ser Phe
850 855 860

Gly Leu Glu Glu Ser Phe Glu Ala Val Trp Ala Asn Asn Ser Leu Val
865 870 875 880

Arg Cys Asn Gln Val Val Leu His Thr Thr Gln Lys Ser Gln Val Phe
885 890 895

Pro Leu Ser Leu Lys Leu Lys Gly Pro Pro Asp Arg Phe Leu Asp Ser
900 905 910

Pro Asn Pro Met Thr Val Val Val Tyr Asn Cys Ala Met Gly Ser Pro
 915 920 925

Asp Cys Ser Gln Cys Leu Gly Arg Glu Asp Leu Gly His Leu Cys Val
 930 935 940

Trp Asn Asp Gly Cys Arg Leu Arg Gly Pro Leu Gln Pro Leu Pro Gly
 945 950 955 960

Thr Cys Pro Ala Pro Glu Ile Arg Ala Ile Glu Pro Leu Ser Gly Pro
 965 970 975

Leu Asp Gly Gly Thr Leu Leu Thr Ile Arg Gly Arg Asn Leu Gly Arg
 980 985 990

Arg Leu Ser Asp Val Ala His Gly Val Trp Ile Gly Ser Val Ala Cys
 995 1000 1005

Glu Pro Leu Ala Asp Arg Tyr Thr Val Ser Glu Glu Ile Val Cys
 1010 1015 1020

Ala Thr Gly Pro Ala Ala Gly Ala Phe Ser Asp Val Val Thr Val
 1025 1030 1035

Asn Val Ser Lys Glu Gly Arg Ser Arg Glu Gln Phe Ser Tyr Val
 1040 1045 1050

Leu Pro Thr Val His Ser Leu Glu Pro Ser Met Gly Pro Lys Ala
 1055 1060 1065

Gly Gly Thr Arg Ile Thr Ile His Gly Ser Asp Leu Asn Val Gly
 1070 1075 1080

Ser Met Leu Gln Val Leu Val Asn Asp Thr Asp Pro Cys Thr Asp
 1085 1090 1095

Leu Thr Arg Thr Ala Thr Ser Ile Thr Cys Thr Val Pro Gly Gly
 1100 1105 1110

Thr Leu Pro Ser Pro Val Pro Val Cys Val Arg Phe Glu Ser Arg
1115 1120 1125

Gly Cys Val His Gly Asn Leu Thr Phe Trp Tyr Met Gln Asn Pro
1130 1135 1140

Val Ile Thr Ala Ile Ser Pro Gly Arg Ser Pro Val Ser Gly Gly
1145 1150 1155

Arg Thr Ile Thr Val Ala Gly Glu Arg Phe His Met Val Gln Asn
1160 1165 1170

Val Ser Met Ala Val His His Ile Gly Arg Glu Pro Thr Phe Cys
1175 1180 1185

Lys Val Leu Asn Ser Thr Leu Ile Thr Cys Pro Ser Pro Gly Ala
1190 1195 1200

Leu Ser Asn Ala Ser Ala Pro Val Asp Phe Phe Ile Asn Gly Arg
1205 1210 1215

Ala Tyr Ala Asp Glu Ala Ala Glu Glu Leu Leu Asp Pro Ala Glu
1220 1225 1230

Ala Gln Arg Gly Ser Arg Phe Arg Leu Asp Tyr Leu Pro Asn Pro
1235 1240 1245

Gln Phe Ser Thr Ala Lys Arg Glu Lys Trp Ile Lys His His Pro
1250 1255 1260

Gly Glu Pro Leu Thr Leu Val Ile His Lys Glu Gln Asp Ser Leu
1265 1270 1275

Gly Leu Glu Ser His Glu Tyr His Ile Lys Ile Gly Gln Val Ser
1280 1285 1290

Cys Asp Ile Gln Ile Ile Ser Asp Arg Val Ile His Cys Ser Val
1295 1300 1305

Asn Glu Ser Leu Gly Thr Ala Glu Gly Gln Leu Pro Ile Thr Ile
1310 1315 1320

Gln Val Gly Asn Phe Asn Gln Thr Ile Ala Thr Leu Gln Leu Gly
1325 1330 1335

Gly Ser Glu Thr Ala Ile Val Val Ser Ile Val Ile Cys Ser Val
1340 1345 1350

Leu Leu Leu Leu Ser Val Val Ala Leu Phe Val Phe Cys Thr Lys
1355 1360 1365

Ser Arg Arg Ala Glu Arg Tyr Trp Gln Lys Thr Leu Leu Gln Met
1370 1375 1380

Glu Glu Met Glu Ser Gln Ile Arg Glu Glu Ile Arg Lys Gly Phe
1385 1390 1395

Ala Glu Leu Gln Thr Asp Met Thr Asp Leu Thr Lys Glu Leu Asn
1400 1405 1410

Arg Ser Gln Gly Ile Pro Phe Leu Glu Tyr Lys His Phe Val Thr
1415 1420 1425

Arg Thr Phe Phe Pro Lys Cys Ser Ser Leu Tyr Glu Glu Arg Tyr
1430 1435 1440

Val Leu Pro Ser Lys Thr Leu Asn Ser Gln Gly Gly Ser Pro Pro
1445 1450 1455

Gln Glu Thr His Pro Leu Leu Gly Glu Trp Asn Ile Pro Glu His
1460 1465 1470

Cys Arg Pro Ser Met Glu Glu Gly Ile Ser Leu Phe Ser Ser Leu
1475 1480 1485

Leu Asn Asn Lys His Phe Leu Ile Val Phe Val His Ala Leu Glu
1490 1495 1500

Gln Gln Lys Asp Phe Ala Val Arg Asp Arg Cys Ser Leu Ala Ser
1505 1510 1515

Leu Leu Thr Ile Ala Leu His Gly Lys Leu Glu Tyr Tyr Thr Ser
1520 1525 1530

Ile Met Lys Glu Leu Leu Val Asp Leu Ile Asp Ala Ser Ala Ala
1535 1540 1545

Lys Asn Pro Lys Leu Met Leu Arg Arg Thr Glu Ser Val Val Glu
1550 1555 1560

Lys Met Leu Thr Asn Trp Met Ser Ile Cys Met Tyr Gly Cys Leu
1565 1570 1575

Arg Glu Thr Val Gly Glu Pro Phe Phe Leu Leu Leu Cys Ala Ile
1580 1585 1590

Lys Gln Gln Ile Asn Lys Gly Ser Ile Asp Ala Ile Thr Gly Lys
1595 1600 1605

Ala Arg Tyr Thr Leu Asn Glu Glu Trp Leu Leu Arg Glu Asn Ile
1610 1615 1620

Glu Ala Lys Pro Arg Asn Leu Asn Val Ser Phe Gln Gly Cys Gly
1625 1630 1635

Met Asp Ser Leu Ser Val Arg Ala Met Asp Thr Asp Thr Leu Thr
1640 1645 1650

Gln Val Lys Glu Lys Ile Leu Glu Ala Phe Cys Lys Asn Val Pro
1655 1660 1665

Tyr Ser Gln Trp Pro Arg Ala Glu Asp Val Asp Leu Glu Trp Phe
1670 1675 1680

Ala Ser Ser Thr Gln Ser Tyr Val Leu Arg Asp Leu Asp Asp Thr
1685 1690 1695

Ser Val Val Glu Asp Gly Arg Lys Lys Leu Asn Thr Leu Ala His
1700 1705 1710

Tyr Lys Ile Pro Glu Gly Ala Ser Leu Ala Met Ser Leu Thr Asp
1715 1720 1725

Lys Lys Asp Ser Thr Leu Gly Arg Val Lys Asp Leu Asp Thr Glu
1730 1735 1740

Lys Tyr Phe His Leu Val Leu Pro Thr Asp Glu Leu Val Glu Pro
1745 1750 1755

Lys Lys Ser His Arg Gln Ser His Arg Lys Lys Val Leu Pro Glu
1760 1765 1770

Ile Tyr Leu Thr Arg Leu Leu Ser Thr Lys Gly Thr Leu Gln Lys
1775 1780 1785

Phe Leu Asp Asp Leu Phe Lys Ala Ile Leu Ser Ile Arg Glu Asp
1790 1795 1800

Lys Pro Pro Leu Ala Val Lys Tyr Phe Phe Asp Phe Leu Glu Glu
1805 1810 1815

Gln Ala Glu Lys Arg Gly Ile Ser Asp Pro Asp Thr Leu His Ile
1820 1825 1830

Trp Lys Thr Asn Ser Leu Pro Leu Arg Phe Trp Val Asn Ile Leu
1835 1840 1845

Lys Asn Pro Gln Phe Val Phe Asp Ile Glu Lys Thr Asp His Ile
1850 1855 1860

Asp Ala Cys Leu Ser Val Ile Ala Gln Ala Phe Ile Asp Ala Cys
1865 1870 1875

Ser Ile Ser Asp Leu Gln Leu Gly Lys Asp Ser Pro Thr Asn Lys
1880 1885 1890

Leu Leu Tyr Ala Lys Glu Ile Pro Glu Tyr Arg Lys Thr Val Gln
1895 1900 1905

Arg Tyr Tyr Lys Gln Ile Gln Asp Met Thr Pro Leu Ser Glu Gln
1910 1915 1920

Glu Met Asn Ala His Leu Ala Glu Glu Ser Arg Lys Tyr Gln Asn
1925 1930 1935

Glu Phe Asn Thr Asn Val Ala Met Ala Glu Ile Tyr Lys Tyr Ala
1940 1945 1950

Lys Arg Tyr Arg Pro Gln Ile Met Ala Ala Leu Glu Ala Asn Pro
1955 1960 1965

Thr Ala Arg Arg Thr Gln Leu Gln His Lys Phe Glu Gln Val Val
1970 1975 1980

Ala Leu Met Glu Asn Asn Ile Tyr Glu Cys Tyr Ser Glu Ala
1985 1990 1995

<210> 16
<211> 6931
<212> DNA
<213> mouse

<400> 16
gggagatggg ctgtgggcgt ggtctccacg gagccgcccc cgggctgagc gcctcgccag 60
agtcggggccg gggcgccggg gccggggggcg gcaggcgccg gcaggaagcg cctcgcggcc 120
cgggcccgcc cccgcctct cgccgcctcc gagctcccgg ctcccggccg cgccgcgccc 180

catgcactcg ccgcgccgcg cagcccgcgc tcgcctggat ggctcgtcgc gccgcgggcg 240
gcgcaccccc tagcgcccg gccgccgcgg ccgtccccctt gcgtccgcgc cctcactcgc 300
ggggccctgg tctgctgccg ctgcctctgc tgctgctgct cggggcggca cgggccggcg 360
ccctagagat ccagcgccgt tccccctcgc ccacgccac caacaacttc gccctggacg 420
gcacggcggg caccgtgtac ttggcggcag tgaaccgcct gtaccaactg tcgagtgcc 480
acttgagcct ggaagccgag gcgaccgtgg gtcccgtgcc ggacagcccc ctgtgtcacg 540
ccccgcagct cccgcaggcc tcgtgcgagc acccgcggcg cctcacggac aactacaaca 600
aaatcctgca gttggacccg ggccagggtc tgggtggcgc gtgcggctcc atctaccagg 660
gtctgtgcc gctgaggcgc cggggcaaca tctcagccct ggccgtgagc tttccgcctg 720
ccgcgccgac cgcagaaccg gtcaccgtgt tccccagcat gctcaacgtg gccgccaacc 780
acccaacgc gtccactgtg ggactgggtc tgccgcctac ctcgggcacc gggggcagcc 840
gtctgctcgt gggcgccacg tacaccggct tcggcagcgc tttcttcccg cgcaaccgta 900
gcctagaaga ccaccgcttc gagaacacgc ccgagatcgc tatccgctcc ctggacgcgc 960
gtggagactt ggccaagctc ttcaccttcg accttaacc gtcggacgat aacatcctga 1020
agatcaagca gggcgccaag gagcagcaca agctgggctt cgtgcgtgcc ttcttgacc 1080
cggcggtgcc accgcacagc gcgcagccct acgcgtacct ggcgctcaac agcgaggcgc 1140
gtgcgggcga caaggacagc caggcgcgca gcctgctggc gcgcatctgc ctgccccgcg 1200
gcgcgggtgg cgacgccaag aagctcaccg agtcctacat ccaactgggc ttgcagtgcg 1260
cgggcggcgc gggccgcggc gacctctaca gccgcctcgt gtcggttttc cccgcgcgcg 1320
agcagtictt cgccgtcttc gagcggtccc agggcgcccc aggtgcccgc aacgccccgg 1380
ccgcgctttg cgccttccgc ttcgacgacg tgcaggctgc cattcgtgca gcgcgcaccg 1440
cctgcttcgt ggagccggcg cccgacgtgg tggcgggtgtt ggacagtgtg gtgcagggca 1500
ccgggccggc ctgcgagagc aagcgcaaca tacagctgca gccggagcaa ctggattgcg 1560
gagcggccca cctgcagcac cactgacca tcctgcagcc gctgagggca tcgcccgtgt 1620
tccgtgctcc agggctcacg gccgtggctg tggccagtgc caacaactac acggccgtct 1680

ttctgggcac cgccacaggg aggctcctca agatcagcct gaacgagagc atgcaggtag 1740
taagcaggcg agtgctgact gtagcctatg gggagcctgt gcatcacgtc atgcagtttg 1800
accccatgga tcctggttac ctatacctga tgacatccca ccagatggcc cgagtgaagg 1860
tggcagcgtg tgaggtacac tccacctgcg gggactgctg gggatgcggcc gatgcctact 1920
gtggttgggtg cactctggag acccggtgca cactccagca ggattgcacc aactccagcc 1980
agccacattt ctggaccagt gccagtgagg gcccagccg ctgccctgcc atgacagtac 2040
tgccctcgga gattgatgtg caccgggact acacaggtat gatcttacag atctcaggaa 2100
gcctgcccag cctcagcggc atggagatgg cttgtgacta tggaaatggc gttcgaacgg 2160
tggcccgggt accctggccct gcctatgac atcagattgc ctactgcaat ctctgcccc 2220
gggcccagtt tccatcctt cctgctggcc aggaccacgt gaccgttgag atgtctgtaa 2280
gggtcaaagg acacaacatt gtctcagcca atttaccat ctacgactgc agccgaattg 2340
gacaagtcta ccccataca gcctgtacca gctgcctgtc cacacagtgg cttgtctcct 2400
gggtgcatcca gctgcattca tgtgtctcca accagtctca gtgccaggac tcgccaacc 2460
ccacgagtcc tcaggactgt cccagatcc tgccctgcc cctagcgccc gtgcccacag 2520
gtggctccca agacatcctg gtgcccctga ctaaagccac cttcttccat ggttcctccc 2580
tcgagtgcag ctttgggctg gaagagagct ttgaggctgt atgggcgaat aactcactgg 2640
tccgctgcaa ccaagtgggt ctgcacacaa cccagaagag ccaggtattt cactgagtc 2700
tgaagctgaa ggggcccga gaccgattcc tagacagccc taaccccatg acagttgtgg 2760
tctacaactg tgctatgggc agccctgact gttcccagt cctgggcccgt gaggacctgg 2820
gtcaccictg tgtttggaa gatggctgtc gtctaagagg gccctgcag ccactccctg 2880
gcacctgccc agcccctgaa atccgagcga ttgagcctct gagtggcccc ttggacgggtg 2940
ggactttgct gaccatccgt ggcaggaact tgggccgtcg gctcagtgat gtggcacatg 3000
gtgtgtggat tggcagtgtg gcctgtgaac ccctggctga cagatacacc gtttcagagg 3060
agatcgtgtg tgccacaggg cctgccgcag gggccttctc agacgtggta acggtgaacg 3120
tctccaagga aggcaggtct cggaacagt tctcctatgt gctgcccacg gtccactcac 3180

tggagccttc catgggcccc aaggccgggg gtacaaggat caccattcac ggcagtgacc 3240
tcaacgtggg ctctatgctc caggtcctgg tgaatgacac ggaccctgc acagatctta 3300
cgcgcacagc caccagcatc acctgcactg tgccaggggg taccctgccc tctccagtgc 3360
ctgtgtgtgt gcgcttcgag agccggggct gcgtgcacgg aaacctcacc ttcttgtaca 3420
tgcagaacct agtcatcaca gccatcagcc caggccgcag ccctgtcagt ggcggcagga 3480
ccatcactgt ggctggcgaa cgcttcaca tgggtgcagaa tgtatcaatg gctgtacacc 3540
acattggccg ggagcccacg ttctgcaagg ttctcaactc cacactcatc acctgcccac 3600
ctcctggagc cctgagcaat gcttcggcgc ctgtagactt cttcatcaat ggccgggcat 3660
atgcagacga ggcagccgag gagctgctgg accctgcaga ggcacagagg ggcagccggt 3720
tccgcctaga ctacctccc aaccacagt tctccacagc caagaggag aagtggatca 3780
aacatcacc aggagagccg ctcacctcg tcatccataa ggagcaagac agcctggggc 3840
tggagagcca tgagtaccac atcaagattg gccagggtgc ctgcgacatc cagatcatct 3900
cagacagagt catccactgc tcagtcaatg agtcgctggg cacggctgaa ggacagctgc 3960
ccatcacaat ccagggtggg aacttcaacc agaccatcgc cacactgcaa ctggggggca 4020
gcgagacggc catttgtgtg tccatcgta tctgcagtgt cctgttgctg ctgtctgtgg 4080
ttgctctgtt cgtcttctgc accaagagcc gccgtgccga gcgctactgg cagaagacct 4140
tgctgcagat ggaagagatg gagtctcaga tccgagagga gatccgtaaa ggctttgcgg 4200
agctgcagac agacatgacg gatctacca aggagctgaa ccgcagccag ggcattccct 4260
tcttggagta caagcacttc gtgactcgaa cttcttccc caagtgtct tccctctatg 4320
aagagcggta tgtgctgccc tcgaagacct tcaactcca ggggtggctcc ccgccacagg 4380
aaaccaccc actgctggga gagtggaaca tccctgaaca ctgtcggccc agcatggagg 4440
aggggatcag cctgttctcc tctactgctc acaacaagca ctctctcatc gtcttcgtcc 4500
atgctctgga gcagcagaag gacttcgcag tgcgtgacag gtgcagcctg gcgtccctgc 4560
tgaccatcgc gctgcacggc aagctggagt actatacgag catcatgaag gagctgctcg 4620
tggacctcat cgacgcctcg gcggccaaga accccaagct catgttgagg cgacaggagt 4680

ctgtggtgga gaagatgctt accaactgga tgtccatctg catgtacggc tgcctgaggg 4740
agacagtagg tgagccgttc ttcctgctgt tgtgtgcat caagcagcag atcaacaaag 4800
gctccatcga cgccatcaca ggcaaagccc gctacacact caacgaggag tggctgctga 4860
gggagaacat tgaggccaag ccccggaact tgaacgtgtc cttccagggc tgtgggatgg 4920
actccctcag cgtgcgggcc atggacaccg acacgtgac gcaggtgaag gagaagatcc 4980
tggaagcctt ctgcaagaac gtcccctact cacagtggcc gcgggcggag gacgtggacc 5040
ttgaatggtt tgcctcgagt acccagagct acgtcctccg ggacctggat gacacatcag 5100
tggtggagga cggccgtaag aaactgaaca cactggccca ctacaagata cctgagggcg 5160
cctccctagc catgagcctc acagacaaga aggacagtac cctgggcaga gtgaaagact 5220
tggaacacaga aaagtatttc catttggtgc tacctacgga tgagctggta gaggctaaga 5280
aatctcaccg gcagagccac cgcaagaaag tattgccaga gatctacctg accgcctgc 5340
tgtccacca gggcacgctg cagaagttcc tagatgacct gttcaaggct atcctgagca 5400
tccgagagga caagccccg ctggctgtca agtatttctt tgacttccta gaggaacagg 5460
cggagaagag aggcattctc gacctgaca ccctgcatat ctggaagacc aacagccttc 5520
ccctgcgctt ctgggtgaac atcttaaaaa atccccagtt tgtcttcgac atagagaaga 5580
cggaccacat cgacgcctgc ctgtctgtca tcgcacaggc cttcatcgat gcctgctcca 5640
tctctgacct gcagctgggc aaggactcac ccaccaaaa gcttctgtac gcgaaggaga 5700
tccctgagta ccggaagacc gtacagcgct attataaaca gatccaagac atgacgccg 5760
tcagcgagca ggaaatgaac gcacacctgg ccgaggagtc tcggaatac cagaatgagt 5820
tcaacacaaa cgtggccatg gctgagattt ataaatatgc taagaggtat cgaccacaga 5880
tcatggctgc cctggaggcc aacccacag cccgcaggac ccagctacag cacaagttg 5940
aacagggtgtt ggctctgatg gaaaacaata tctatgagt ttacagcgag gcctgatgca 6000
gaagagtgc caggagcttc ggccaggag acggcgtgca ggccacttg cctccactg 6060
gtttcttccc-cacatctctc acttgggctg ggaactgaca gaggagcctg ctgggctagg 6120
agtgggggac actggcctct tagtgcccgg ctgccgagct cttggccttg tcccctgggg 6180

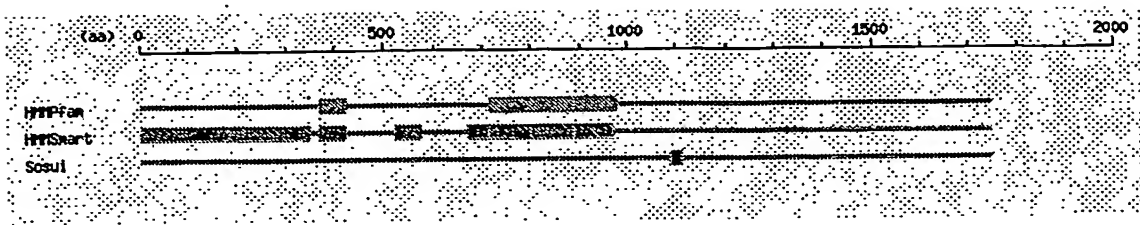
catctctgtc ccctccacct gcccaagacc caactctagg atgaaggcct tgaatatcga 6240
 tcgctgccag tccctaataa gactttccct gcccaaccagg acagcctgga ccatgcctgc 6300
 ctgttacttg tttcaggctg ctcagcacac attgggagag gtggccatat cccagaacac 6360
 tacctcatcc acctggcaga gggaatttct gcttcagcca ccaagcagtt gtctgtgtcc 6420
 ctcatccaga gggggccttg gccaccaaca gttccaaacc aggtcagctg ttagccgtct 6480
 cattggccag tggcagcatg ggcaagtccc attgcccaca gaacgggtgga gagaggggga 6540
 caggctgggg gttcctggcc ccaggaaagg gaggaaggcg aggatgcagg gctgtagctg 6600
 gactactcag tcttcctgga agtgtttcta aagagcacca cttttttttg tttttgttt 6660
 ttttaagaaaa aaaaaacttt tatatatata aacaaaaact tatgcaccaa ctgtgaatag 6720
 ctgccgcttg tgcagatccc caggggctcc cggtgacaca ctggaaatga ctgttcagg 6780
 ggacagaaaa tactcatctg tccccagcac agccccacc ccacccccca tagctgctga 6840
 gactggctca cagccaagg gggctgggct ggaggggaag gctgggactc tctggaacat 6900
 tctttataat aaaagcctgc cgggaaaacc t 6931

<210> 17
 <211> 484
 <212> DNA
 <213> mouse genome

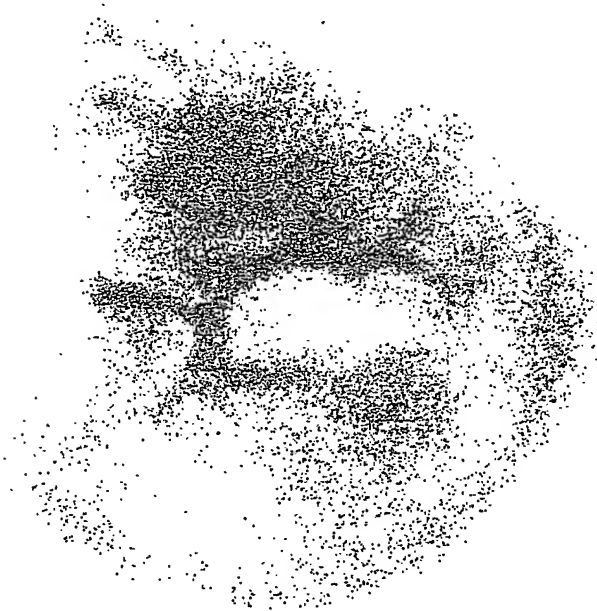
<400> 17
 tgacctcgga ccgcggggcg tggcccagag gcgtggccgg gggcgtggcc cggggcgaaa 60
 gggcgtgggc caagctgctg gggcggggag atgggctgtg ggcgtggtct ccacggagcc 120
 gccccgggc tgagcgctc gccagagtcg ggccggggcg ccggggccgg gggcggcagg 180
 cgcgggcagg aagcgctcg cgccccgggc ccgcccccg cctctcgccg cctccgagct 240
 cccggctccc ggccgcgccg cgcccatgc actcgccgcg ccgcgcagcc cgcgctcgcc 300
 tggatggctc gtcgcgccg gggcggcgca cccctagcg cccgggcccgc cgcgggcgtc 360
 cccttgctc cgcgccctca ctcgcggggc cctggtctgc tgccgctgcc tctgctgctg 420
 ctgctcgggg cggcacgggc cggcgcccta aagatccagc gccgtttccc ctcgccacg 480
 ccca 484

【書類名】 図面

【図 1】



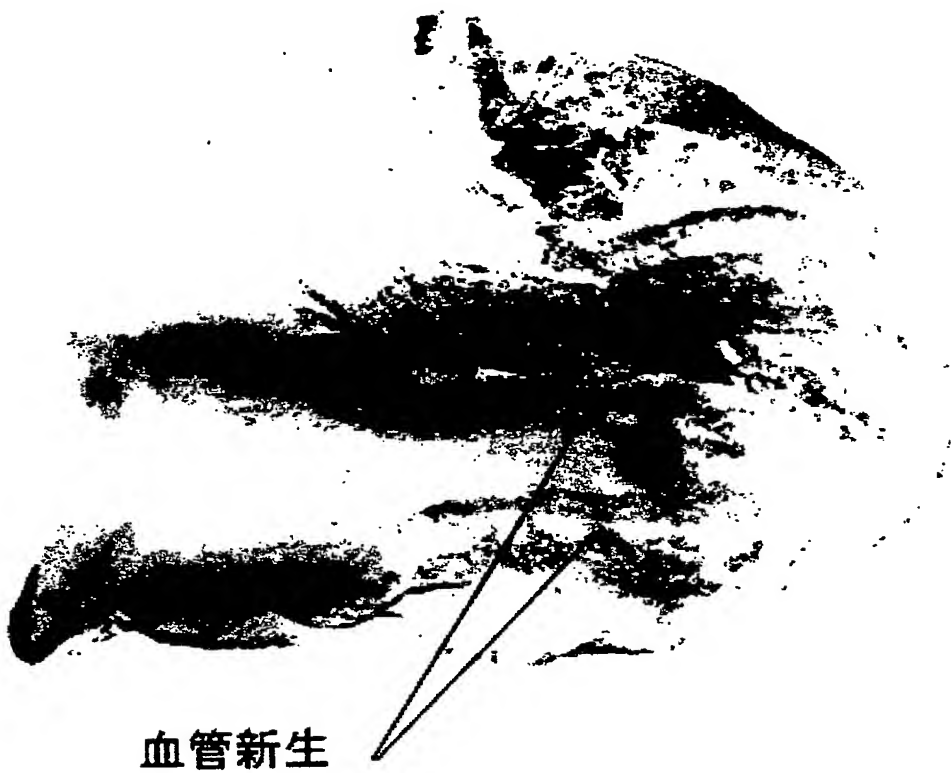
【図 2 A】



【図 2 B】



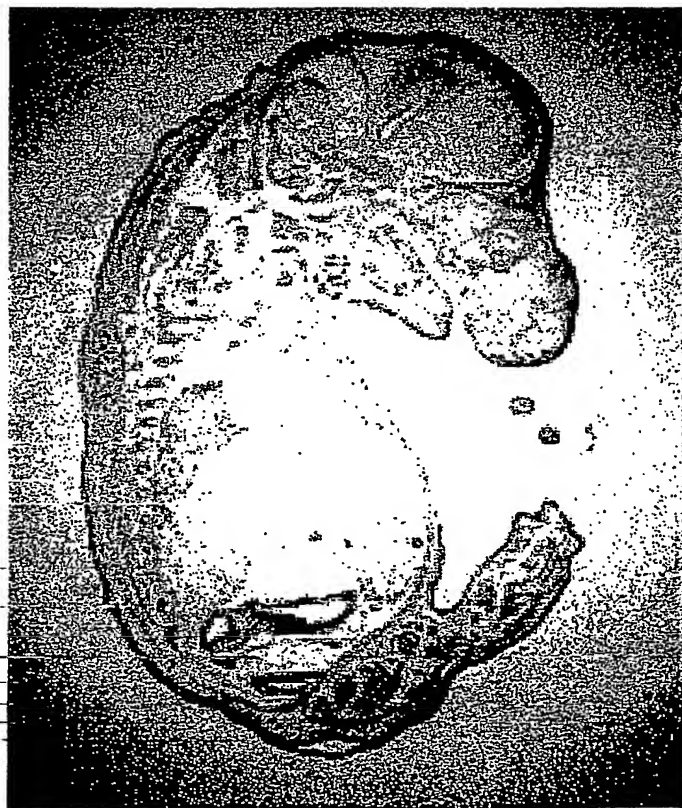
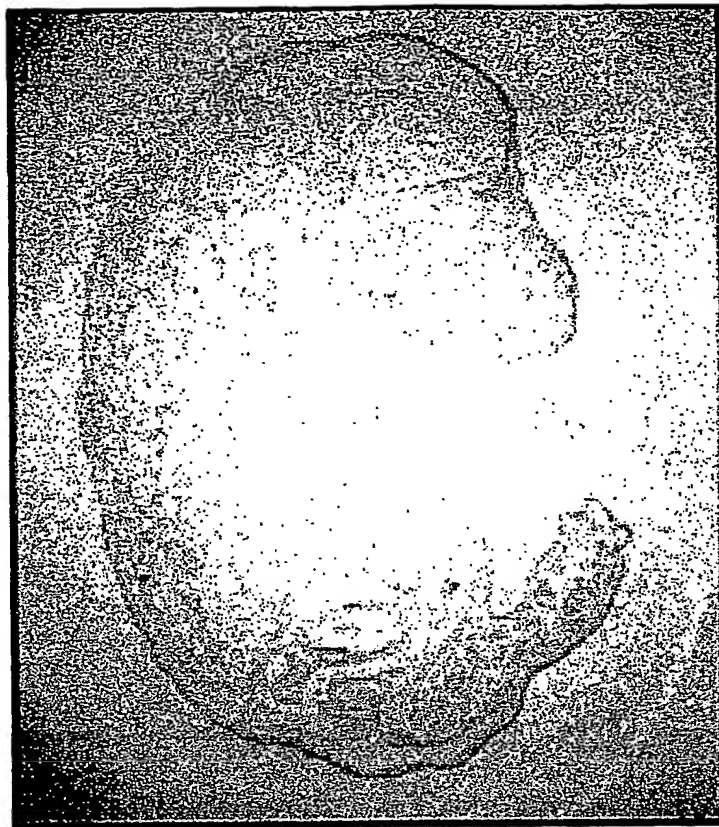
【図 2 C】



【図 2 D】



【図 3 A】



【図 3 B】



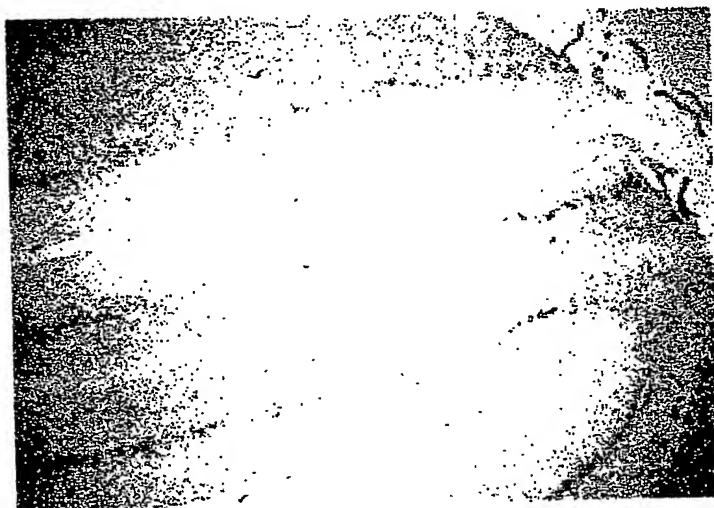
【図 4 A】













【図 4 B】



【図 4 C】

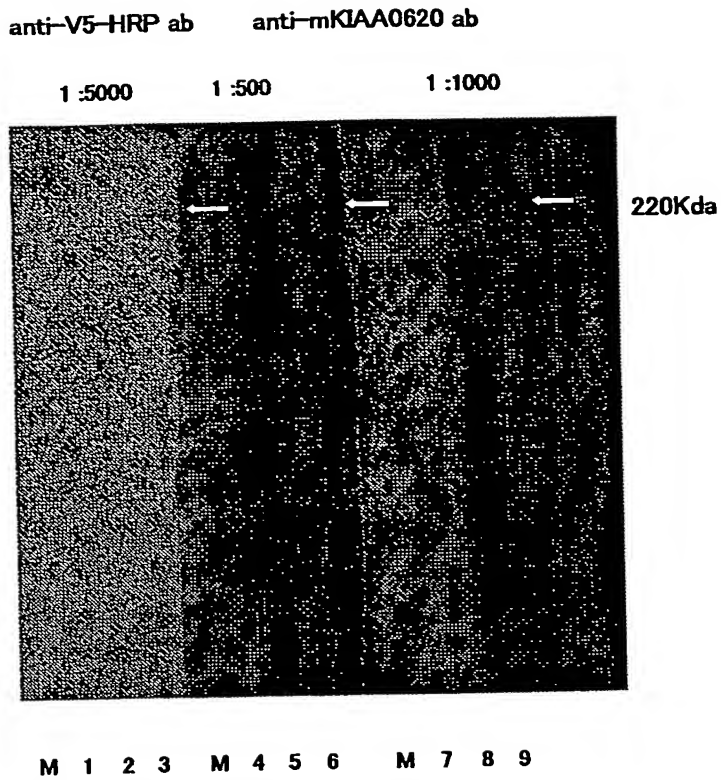


【図 5】

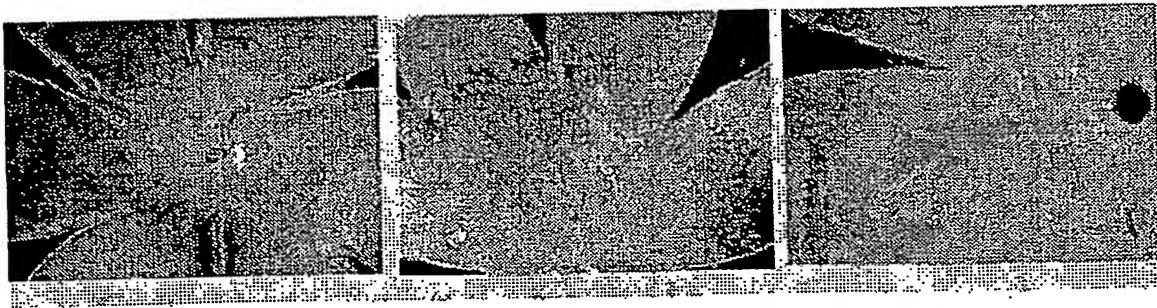
embryo (d.p.c.)	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5
Flk					
mKIA0620					
expression	—	+	+	+	+

RT-PCR
(35 cycles)

【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 各種臓器の於ける血管新生やその機能保全に、各種臓器あるいは癌や臓器再生時の血管新生に、各種臓器の細胞の増殖・分化やその機能保全に、あるいは老化、機能不全に関わる予防薬、治療薬、または検査薬のスクリーニング等に有用な新規DNA及び該DNAを含む遺伝子、該DNAにコードされる新規ポリペプチド及び該ポリペプチドを含む組換え蛋白質、新規ポリペプチドに対する抗体を提供すること。

【解決手段】 以下の（a）又は（b）のポリペプチドをコードする塩基配列から成るDNA：（a）配列番号：1又は配列番号15で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列の一部又は全部から成るポリペプチド、（b）配列番号：1又は配列番号15で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列から成り、（a）のポリペプチドと実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチド。

【選択図】 図1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-229871
受付番号	50401328127
書類名	特許願
担当官	小暮 千代子 6390
作成日	平成16年 8月12日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成16年 8月 5日

【書類名】 出願人名義変更届
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2004-229871
【承継人】
【持分】 1/2
【識別番号】 596175810
【氏名又は名称】 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所
【承継人代理人】
【識別番号】 100100181
【弁理士】
【氏名又は名称】 阿部 正博
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 053419
【納付金額】 4,200円

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-229871
受付番号	50401451420
書類名	出願人名義変更届
担当官	小暮 千代子 6390
作成日	平成16年10月 8日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成16年 8月27日
【承継人】	
【識別番号】	596175810
【住所又は居所】	千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7
【氏名又は名称】	財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	100100181
【住所又は居所】	千葉県船橋市前原西2-14-1 ダイアパレス 津田沼1001
【氏名又は名称】	阿部 正博

特願 2004-229871

出願人履歴情報

識別番号

[300061835]

1. 変更年月日

2003年 7月 7日

[変更理由]

住所変更

住 所

兵庫県神戸市中央区港島南町2丁目2番

氏 名

財団法人先端医療振興財団

特願 2004-229871

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596175810]

1. 変更年月日 2002年 6月13日

[変更理由]

住所変更

住 所

千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7

氏 名

財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

特願 2004-229871

出願人履歴情報

識別番号 [503360115]

1. 変更年月日	2004年 4月 1日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	独立行政法人科学技術振興機構